



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2014

Ana Cristina de Azevedo Quaresma **Isolamento e modificação de xilanas da pasta branca.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Dr. Dmitry Victorovitch Evtugin, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e ao Engº. António Paulo Mendes de Sousa, do RAIZ – Instituto de Investigação da Floresta e do Papel.

Dedico este trabalho ao meu namorado Leandro Melo.

O júri

Presidente

Prof. Dra. Maria Inês Purcell de Portugal Branco

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Dmitry Victorovitch Evtugin

Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dra. Paula Cristina de Oliveira Rodrigues Pinto

Investigadora auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Universidade do Porto

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Dmitry Victorovitch Evtyugin e ao meu co-orientador Eng. Paulo Mendes Sousa a total disponibilidade e exímia orientação ao longo deste trabalho.

Agradeço à fábrica de Cacia do grupo Portucel Soporcel a disponibilidade da pasta branqueada de *Eucalyptus globulus*.

Agradeço ao Instituto de Investigação da Floresta e Papel - RAIZ a disponibilidade e ajuda que me proporcionou ao longo do trabalho experimental, em particular ao Bruno Alves pelas técnicas e ensinamento partilhados

Agradeço aos meus colegas de laboratório, em particular à Sónia Prozil e Vânia Dias as técnicas e ensinamentos partilhado.

Agradeço à minha colega e companheira destes últimos cinco anos, Eva Cabral, pelos risos, choros, companheirismo e acima de tudo a sua amizade.

palavras-chave

Eucalyptus globulus, pasta branqueada, xilana, extração alcalina, modificação, cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), dihidrazida do ácido adipico (ADH), formaldeído, diaminourea.

resumo

A remoção de xilanas na pasta branca kraft pode ser uma prática convencional para a produção de materiais celulósicos para uso não papaleiros, tais como derivados de celulose, celulose microfibrilada, entre outros.

As xilanas têm uma ampla gama de aplicações nas indústrias farmacêuticas, papaleiras e alimentares. Na indústria da pasta e papel, a xilana pode ser utilizada como revestimento dos papéis substituindo polissacarídeos utilizados normalmente, como o amido. Para a aplicação das xilanas nesta área, a sua massa molecular tem de ser muito superior à das xilanas existentes na pasta celulósica, pelo menos 50 kDa.

O objetivo deste trabalho consiste no estudo da possibilidade de extração e isolamento de xilanas de pasta branca kraft de eucalipto, elucidar a possibilidade de aumento do peso molecular das mesmas para posterior utilização na indústria papaleira.

A xilana foi extraída com soluções aquosas de NaOH a 10% durante 1 hora, sendo posteriormente acidificada e isolada sob a forma de precipitado. Aditivamente, as xilanas foram purificadas por diálise contra água destilada. As xilanas obtidas foram caracterizadas por teor de cinzas, composição de açúcares, estrutura e peso molecular. O teor de cinzas foi avaliado recorrendo ao método termogravimétrico, a análise de açúcares por cromatografia gasosa com alditol-acetato, a estrutura da xilana foi elucidada recorrendo às técnicas de ^1H RMN e ^{13}C RMN em estado sólido e o peso molecular foi utilizada a técnica de cromatografia por permeação de gel.

Os resultados obtidos demonstraram que as xilanas não purificadas apresentam teor de cinzas elevado (55 – 81%), o peso molecular médio ponderal das xilanas extraídas estavam compreendidos no intervalo dos 26,3 – 28,2 kDa. Pela análise dos monossacarídeos e ^1H RMN podemos concluir que as xilanas isoladas são 2 – O – metil – α – D – glucurono – D – xilanas.

A modificação das xilanas foi efetuada utilizando os métodos de bioconjugação em soluções aquosas num sistema acidificado de ADH na presença de EDC e através de derivados de metilol em dimetilsulfóxido. Os produtos derivatizados foram caracterizados por teor de cinzas, estrutura e peso molecular. O teor de cinzas foi avaliado recorrendo ao método termogravimétrico, a estrutura da xilana foi elucidada recorrendo às técnicas de FTIR, ^1H RMN e ^{13}C RMN em estado sólido e a massa molecular foi utilizada a técnica de cromatografia por permeação de gel.

O peso molecular médio ponderal através do método de bioconjugação chegou quase aos valores desejados para este tipo de compostos.

keywords

Eucalytus globulus, bleached pulp, xylan, alcali extraction, modification, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide chloride (EDC), adipic acid dihydrazide (ADH), formaldehyde, carbohydrazide.

abstract

The removal of xylan in kraft bleached pulp can be a conventional practice for the production of non-cellulosic materials papermakers use, such as cellulose derivatives, microfibrillated cellulose, among others. The xylan have a wide range of applications in the pharmaceutical, paper and food industries. In the pulp and paper industry, the xylan can be used to coat papers replacing normally used polysaccharides such as starch. For the application of xylan in this area, its molecular weight must be much higher than the existing xylan in pulp, at least 50 kDa. The objective of this work is to study the possibility of extraction and isolation of xylan from kraft bleached eucalyptus pulp, to elucidate the possibility of increasing the molecular weight of these for later use in the paper industry.

Xylan was extracted with aqueous solution of NaOH 10% for 1 hour and subsequently acidified and isolated in the form of precipitate. Additively, the xylan were purified by dialysis against distilled water. The xylan obtained were characterized by ash content, sugar composition, structure and molecular weight. The ash content was evaluated using the thermogravimetric method, the analysis of sugars by gas chromatography with alditol acetate, the structure of xylan was elucidated using techniques ^1H NMR and solid state ^{13}C NMR and for molecular mass was used chromatography technique.

The results showed that the non-purified xylan show a high ash content (55-81%), the weight average molecular weight of the extracted xylan were in the range of 26.3 to 28.2 kDa. Form the analysis of monosaccharides and ^1H NMR we can conclude that isolated xylans are 2-O-methyl- α -D-glucurono - D-xylan.

The modification of xylan was carried out using the methods of bioconjugation in aqueous solutions in a acidified system with ADH in the presence of EDC and via methylol derivatives in dimethylsulphoxide solutions. The derivatized products were characterized by ash content, structure and molecular weight. The ash content was evaluated using the thermogravimetric method, the xylan structure was elucidated using FTIR techniques, ^1H NMR and ^{13}C NMR in solid form and the technique of molecular weight by gel permeation chromatography was employed.

The average molecular weight of the compounds obtained by the method of bioconjugation reached almost the desired values.

Índice

Nomenclatura.....	xi
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Química da Madeira do <i>Eucalyptus globulus</i>	3
2.1.1 Celulose	4
2.1.2 Hemiceluloses	5
2.1.2.1 Xilana	5
2.1.3 Lenhina.....	6
2.1.4 Extratáveis	8
2.2 Produção de pasta pelo método <i>kraft</i>	9
2.3 Branqueamento de pastas.....	12
2.4 Isolamento de xilanas	13
2.5 Modificação de Xilanas.	14
3 Procedimento Experimental	16
3.1 Determinação do teor de pentosanas.	16
3.2 Extração e isolamento de xilanas.....	17
3.3 Caracterização das xilanas.	19
3.3.1 Cromatografia por permeação em gel (GPC).	19
3.3.2 Cromatografia gasosa (GC).	20
3.3.3 Ressonância Magnética Nuclear de próton (^1H RMN).....	21
3.3.4 Ressonância magnética nuclear com carbono-13 (^{13}C RMN).	22
3.3.5 Análise Termogravimétrica (TGA).	22
3.3.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).	22
3.4 Modificação das xilanas	23
3.4.1 Modificação de xilanas por reação ADH na presença de EDC, em água.	23
3.4.2 Modificação de xilanas por reação com ADH na presença de formaldeído, em DMSO.	24
3.4.3 Modificação de xilanas por reação com diaminourea na presença de formaldeído, em DMSO.	25
4 Resultados e Discussão	26
4.1 Extração e Isolamento.....	26
4.2 Caracterização das xilanas.	27
4.2.1 Análise Termogravimétrica (TGA).	27
4.2.2 Pesos moleculares das xilanas.	28
4.2.3 Análise de açúcares.	30
4.2.4 Ressonância Magnética Nuclear de próton (^1H RMN).....	31

4.3	Modificação das xilanas.	33
4.3.1	Modificação A: Modificação de xilanas por reação com ADH na presença de EDC, em água.	33
4.3.2	Modificação B: Modificação de xilanas por reação com ADH na presença de formaldeído, em DMSO.	36
4.3.3	Modificação C: Modificação de xilanas por reação com diaminoureia na presença de formaldeído, em DMSO.	37
4.4	Caracterização das xilanas modificadas.	38
4.4.1	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).	38
4.4.2	Peso molecular das xilanas modificadas.	41
4.4.3	Ressonância Magnética Nuclear de próton (^1H RMN).	43
4.4.4	Ressonância Magnética Nuclear com Carbono-13 (^{13}C RMN).	45
4.4.5	Análise Termogravimétrica (TGA).	48
5	Conclusões	49
6	Referências	51
	Apêndice A – Dados experimentais.	54
	Apêndice B – Exemplos de cálculos.	58

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição química da madeira <i>E. globulus</i> , % em peso. (adaptado) (Evtuguin & Neto, 2007).....	8
Tabela 2 - Composição química dos monossacarídeos da madeira do <i>E. Globulus</i> (adaptado). (Pinto, Evtugin, & Neto, 2005).....	8
Tabela 3 - Composição química da pasta não branqueada kraft do <i>E. globulus</i> (Kappa 16-19) (Evtuguin & Neto, 2007).....	11
Tabela 4 - Condições experimentais utilizadas na modificação com EDC/ADH.....	23
Tabela 5 – Condições experimentais utilizadas na modificação de xilanas num sistema formaldeído/ADH.	24
Tabela 6 - Valores de pH, massa final de xilana e rendimento para cada uma das extrações.	26
Tabela 7 - Pesos moleculares médios em massa e número e índice de polidispersidade das xilanas isoladas sob as mesmas condições.	29
Tabela 8 - Composição média de monossacarídeos nas xilanas isoladas.....	30
Tabela 9 – designação e abundância relativa das unidades estruturais da xilana isolada (Xyl ₁).	32
Tabela 10 - Condições gerais da extração alcalina.	54
Tabela 11 - Preparação da amostra e reagentes da extração alcalina.	54
Tabela 12 - pH inicial e final do filtrado de cada extração na fase de neutralização.	55
Tabela 13 - Valores estatísticos ¹ H RMN das unidades estruturais da xyl ₁	55
Tabela 14 - Dados GC - FID.	56

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação abreviada da estrutura mais comum das hemiceluloses (Evtyugin, Tomas, & Silva, 2003)	6
Figura 2 - Principais tipos de ligações entre monómeros identificados na lenhina de <i>E. globulus</i> (Neto & Evtyugin, 2004).....	7
Figura 3 - Teor de pentosanas extraídas para diferentes concentrações de NaOH	14
Figura 4 – Teor de pentosanas extraídas com NaOH a 10% ao longo do tempo.....	14
Figura 5 - Esquema de montagem da extração alcalina	17
Figura 6 - Mudanças observadas ao longo da neutralização (mudança de cor e formação de precipitado a pH~12, 10 e 7 , respetivamente).	18
Figura 7 – da esquerda para a direita: Centrifuga; Precipitado disperso; Precipitado centrifugado.	18
Figura 8 – de esquerda para a direita: Liofilizador; amostra macerada; amostra em tubo	19
Figura 9 - Curvas termogravimétrica para as diferentes xilanas extraídas da pasta branqueada.	27
Figura 10 – Cromatogramas; 1, 2, 3 e 4 correspondem as extrações de pasta refinada a 72°SR, 5 corresponde à extração de pasta refinada a 66°SR.	29
Figura 11 - Espectro de ¹ H RMN a 1D da amostra Xyl ₁ em D ₂ O.....	31
Figura 12 - Estrutura possível da heteroxilana caracterizada.	32
Figura 13 - Mecanismo de reação entre grupos urónicos da xilana e ADH na presença de EDC.	34
Figura 14 – Esquema reacional da reação entre amida e intermediário <i>O</i> -acilureia.	35
Figura 15 - Produtos resultantes da reação de ADH com xilana na presença de EDC.	35
Figura 16 - Mecanismo da reação de modificação da xilana com ADH na presença de formaldeído, em DMSO.	36

Figura 17 -Mecanismo de modificação de xilanas por reação com diaminoureia na presença de formaldeído, em DMSO.	37
Figura 18 - Espectros FTIR das amostras xyl1, xyl 1.1A, xyl 1.2A e xyl 1B.	39
Figura 19 - Espectros FTIR das amostras xyl3, xyl 3.1A, xyl 3.2A, xyl 3B e xyl 3C.	39
Figura 20 - Cromatogramas correspondentes às amostras de xyl ₃ (baixo) e xyl 3.2 A (cima). ...	41
Figura 21 - Espectro de ¹ H RMN a 1D das amostras xyl3 e da xyl 3.2A em D ₂ O.	43
Figura 22 - Espectros de ¹³ C RMN a 1D das amostras de xyl ₃ e xyl 3.2 A.	45
Figura 23 - Espectros de ¹³ C RMN a 1D das amostras de xyl 3B e xyl 3C.	47
Figura 24 - Curvas termogravimétrica das amostras xyl ₃ e xyl 3.1A.	48

Nomenclatura

$^{13}\text{C RMN}$	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
$^1\text{H RMN}$	Ressonância magnética nuclear de próton
<i>A</i>	Área do pico correspondente ao monossacarídeo na análise GC
<i>ADH</i>	Ácido adipico dihidrazida
<i>CMF</i>	Celulose microfibrilada
<i>Da</i>	Dalton
<i>DMA</i>	Dimetilacetamida
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido
<i>ECF</i>	Branqueamento livre de cloro elementar
<i>EDC</i>	1 – etil – 3 – (3 – dimetilaminopropil)carbodiimida
<i>FC</i>	Fator de correção
<i>FR</i>	Fator de resposta
<i>FTIR</i>	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
<i>GC</i>	Cromatografia gasosa
<i>GlcA</i>	Ácido glucurónico
<i>GPC</i>	Cromatografia de permeação de gel
<i>HexA</i>	Ácido hexenurónico
<i>kDa</i>	kiloDalton
<i>LCC</i>	Complexo lenhina – hidratos de carbono
<i>MeGlcP_A</i>	Ácido 4 – <i>O</i> – metil – α – D – glucopiranosilurónico
<i>MGX</i>	4 – <i>O</i> – metil – α – D – glucono – D – xilana
\overline{M}_n	Massa molar média em número
\overline{M}_w	Massa molar média em massa
<i>N</i>	Número de unidades de repetição
<i>PD</i>	Índice de polidispersidade
<i>PI</i>	Padrão interno
<i>rpm</i>	Rotações por minuto

<i>TCF</i>	Branqueamento livre de cloro
<i>TMSP</i>	2,2,3,3-d ₄ -trimetilsililpropionato de sódio
<i>tol</i>	Tolueno
<i>Xylp</i>	D-xilopiranoose
<i>η</i>	Rendimento

1 Introdução

A pasta celulósica é produzida essencialmente a partir de madeira e utilizada predominantemente para a produção de papel e derivados de celulose (Sjostrom, 1993). As madeiras de Eucalipto, hoje em dia, representam a maior fonte de fibra curta na Península Ibérica e América do Sul e têm-se tornado uma matéria-prima atrativa na indústria de produção de pasta e papel noutras regiões do mundo. Entre as diferentes espécies de eucalipto, a espécie *Eucalyptus globulus* é a que tem maior interesse nesta aplicação (Lisboa, Evtyugin, Pascoal Neto, & Goodfellow, 2005; Pinto, Evtyugin, & Neto, 2005)

Pelas suas propriedades, o *E. globulus* é considerado pelos especialistas mundiais como a árvore de fibra ideal para papéis de impressão e escrita. A sua madeira é constituída por fibras de comprimento curto e muito homogéneo, que se caracterizam por uma grande suavidade, um elevado índice de mão, uma excelente rigidez, uma grande estabilidade dimensional e fortes resistências em húmido. Além das excelentes características papleiras da fibra, esta espécie de crescimento rápido e de alto rendimento fabril permite ainda um baixo consumo de químicos nos processos de cozimento e de branqueamento (grupo Portucel Soporcel, 2014).

Para usos não papleiros as hemiceluloses da pasta branca de eucalipto, nomeadamente as xilanas, ainda são um potencial em bruto ao qual é necessário dar maior atenção. Inúmeros estudos têm explorado o uso de polissacarídeos de plantas como substratos de modificações químicas, resultando em produtos com aplicações na mais diversas áreas como na medicina, na agricultura e na produção de filmes. (Fundador, Enomoto-Rogersa, Takemura, & Iwata, 2012). A xilana é um dos biopolímeros mais abundantes presentes na madeira e devem ser removidas da pasta branca de forma a não prejudicar o produto final (Petzold-Welcke, Schwikal, Daus, & Heinze, 2014). Atualmente, as xilanas de pasta branca kraft de eucalipto ainda não foram isoladas e caracterizadas devidamente e nenhum estudo foi realizado no sentido de aumentar o seu peso molecular. Um aumento do peso molecular de xilanas no sentido de atingir as propriedades físicas, químicas e reológicas ideais irá permitir no futuro a substituição do amido como revestimento do papel, melhorando a qualidade de impressão. Nesse sentido,

este trabalho irá centralizar-se num estudo do isolamento, caracterização e modificação de xilanas de pasta branca kraft de eucalipto.

Este trabalho aprovado em 21/06/2013 para o desenvolvimento de Novos Materiais Celulósicos (NMC) a partir de pasta kraft branca de *E. globulus* por parte do promotor Portucel Fábrica de Cacia, SA integra-se no projeto QREN n.º 34169 que visa a obtenção e caracterização de CMF e de xilana removida.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Química da Madeira do *Eucalyptus globulus*.

A madeira é principalmente constituída por células alongadas, orientadas longitudinalmente na direção do caule ligadas entre si por pequenas aberturas denominadas *pinch*. As células variam na forma e função se forem constituintes de folhosas (*hardwoods*) ou resinosas (*softwoods*). As células fornecem força mecânica à árvore e permitem o transporte e armazenamento de líquidos assim como de nutrientes de reserva e resina. Nas resinosas a força mecânica e o transporte de líquidos é feito através de traquídeos. Nas folhosas, as fibras libriformes desempenham o papel de força mecânica e nos vasos é onde ocorre o transporte do líquido. As células parênquimas são responsáveis pelo transporte e armazenamento de nutrientes (Ek, Gellerstedt, & Henriksson, 2009).

Estes dois grupos de árvores também diferem quimicamente em termos de teor de componentes macromoleculares, componentes esses que são a celulose, as hemiceluloses e a lenhina. As folhosas normalmente apresentam maior teor de celulose e menor de lenhina em comparação com as resinosas (Sixta, 2006; Fengel & Wegener, 1984).

As hemiceluloses constituem 20-30% da madeira. São encontradas predominantemente nas paredes primária e secundária das células vegetais. São diferentes da celulose por serem constituídas por várias unidades de açúcares, com cadeias mais curtas, e por ramificação das moléculas da cadeia. São solúveis em soluções alcalinas, e algumas polioses características das folhosas são solúveis em água. São também mais reativas que a celulose (Neto C. , Evtyugin, Pinto, Silvestre, & Freire).

2.1.1 Celulose

A celulose é o principal componente das paredes celulares de todas as plantas. A sua estrutura química primária é muito simples e é caracterizada por uma longa cadeia linear de resíduos de polímero de β – glucopiranosose ligadas entre si por uma ligação glicosídica $\beta(1 \rightarrow 4)$. Na sua forma nativa a celulose apresenta um grau de polimerização compreendido entre 5 – 10 *kDa* e na pasta celulósica entre 1 – 3 *kDa*. (Sjostrom, 1993; Neto & Evtyugin, 2004).

A organização supramolecular da celulose faz com que seja uma substância extremamente complexa e um material muito complicado, com uma habilidade inerente de estabelecer diferentes tipos de pontes de hidrogénio. As ligações podem ser estabelecida dentro da própria cadeia de celulose, ligações intramoleculares, conferindo à molécula rigidez e conformidade, ou entre cadeias de celulose, ligações intermoleculares, permitindo a formação de agregados supramoleculares, como estruturas cristalinas e fibrilas (Sixta, 2006).

A estrutura supramolecular da celulose pode ser descrita hierarquicamente. A fibrila elementar, na qual zonas cristalinas, designadas cristalitos, alternam com zonas amorfas constitui o primeiro nível de organização supramolecular. A celulose cristalina pode apresentar diferentes polimorfos. A Celulose I é a celulose nativa descrita por uma célula unitário monoclinica. Por tratamento químico com soluções alcalinas concentradas ou por dissolução em solventes e re-precipitação, a Celulose I pode ser convertida em Celulose II, a qual possui uma célula unitária mais inclinada. As fibrilas elementares organizam-se em microfibrilas, separadas por zonas constituídas por celulose paracristalina ou amorfa, bem como por hemiceluloses. As microfibrilas, por sua vez, organizam-se em macrofibrilas, separadas por uma matriz de lenhina e hemiceluloses. As macrofibrilas juntam-se em camadas uniformes, as quais constituem os elementos morfológicos básicos da parede celular (Neto & Evtyugin, 2004).

A quantidade de celulose presente na madeira da *E. globulus* encontra-se perto dos 50% (w/w) e possui um grau de cristalinidade de 68%. As dimensões da célula unitária encontram-se dentro dos valores esperados para a celulose I. O grau de polimerização médio da celulose nas pasta kraft cruas de *E.globulus* varia entre 2200 e 2500 (Evtuguin & Neto, 2007; Neto & Evtyugin, 2004).

2.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses encontram-se associadas à celulose na parede celular. Os seus principais constituintes são cinco açúcares neutros, as hexoses glucose, manose, galactose e as pentoses xilose e arabinose. Algumas hemiceluloses contêm ácidos urónicos. As cadeias moleculares são menores que as da celulose, têm grupos associados e podem ser ramificadas em alguns casos. As folhosas contêm mais hemiceluloses que as resinosas e estruturalmente diferentes (Fengel & Wegener, 1984).

As hemiceluloses são divididas em quatro grandes famílias dependendo da unidade da cadeia principal: xilanas, mananas, glucanas e galactanas e a sua percentagem na constituição da madeira varia conforme a espécie de árvore (Fengel & Wegener, 1984).

As hemiceluloses são o segundo componente mais abundante em termos de estrutura macromolecular da madeira da *E. globulus*, representando 24 – 27% (w/w), a seguir à celulose. A hemicelulose mais abundante é a xilana, correspondendo a 16 – 20% (w/w) da proporção anteriormente referida, e as glucanas representam 4 – 6% (w/w). A glucomanana e os componentes pécicos contribuem 1 – 2% (w/w) cada (Evtuguin & Neto, 2007).

2.1.2.1 Xilana

As xilanas são polioses com uma cadeia principal caracterizada por unidades de xilose unidas entre si através de ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$. No caso das folhosas, grupos de ácido 4 – *O* – metil – α – D – glucopiranosilurónico encontram-se ligados a unidades de xilose por ligações glicosídicas $\alpha(1 \rightarrow 2)$ em intervalos irregulares e muitos dos grupos hidroxilos nos carbonos 2 e 3 são substituídos por grupos *O*-acetil. Por outro lado, as xilanas presentes nas resinosas diferem das xilanas presentes nas folhosas devido à ausência de grupos acetil e pela presença de unidades de arabinofuranose ligadas glicosidicamente nas posições $\alpha(1 \rightarrow 3)$ à cadeia principal da xilana. Outro aspecto que distingue as xilanas das resinosas das xilanas das folhosas é a maior abundância de ácidos 4-*O*-metil- α -D-glucopiranosilurónico nas primeiras. (Fengel & Wegener, 1984). Na Figura 1 encontra-se representado um fragmento de *O*-acetil-4-*O*-metil- α -D-glucopiranoxilana de *E. globulus*.

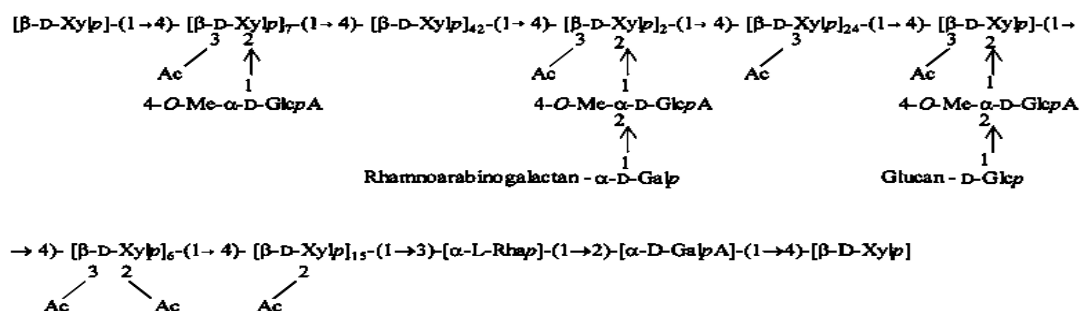


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ABREVIADA DA ESTRUTURA MAIS COMUM DAS HEMICELULOSES (EVTYUGIN, TOMAS, & SILVA, 2003)

As xilanas das plantações de madeira de *E. globulus* apresentam diversas características estruturais muito particulares. Estudos realizados demonstraram que a xilana se trata de uma *O*-acetil-4-*O*-metil-α-D-glucopiranoxilana com uma estrutura claramente distinta das xilanas convencionais sendo que a sua cadeia principal possui ramificações MeGlcA na proporção molar de aproximadamente 1:10 (MeGlcA:Xyl), sendo cerca de 1/3 destas unidades substituídas nas posições *O*-2 por unidades de galactose e glucose. Estes estudos sugerem igualmente que as unidades de galactose e glucose substituintes do ácido 4-*O*-metilglucurónico poderão constituir pontes entre xilanas e outros polissacarídeos na madeira. O terminal redutor da xilana é constituído, como no caso de outras xilanas, por unidades com estrutura -(1→3)-α-D-GalpA-(1→4)-D-Xylp. Outra particularidade das xilanas referidas anteriormente é o facto de este polissacarídeo nas paredes celulares se encontrar acetilado, sendo 53% das unidades de xilose substituídas por grupos acetilo nas posições 1 e/ou 3 (Evtugin, Tomas, & Silva, 2003). A massa molecular da heteroxilana da *E. globulus* na madeira é cerca de 36 kDa, e o seu grau de polimerização varia entre 130 – 150 (Evtugin & Neto, 2007).

2.1.3 Lenhina

A lenhina é o terceiro maior polímero constituinte das paredes celulares das células e é especializado no transporte de líquidos e na força mecânica (Shiraishi & Hon, 2001). Existem três tipos de precursores da lenhina, também chamados de álcoois cinamílicos: o álcool *p*-cumarílico que são unidades de *p*-hidroxifenilpropano (H), o álcool coniferílico que são unidades de guaiacilpropano (G) e o álcool sinapílico que são unidades de siringilpropano (S). Estas unidades não estão igualmente distribuídas nas árvores de resinosas e folhosas. As resinosas são mais homogêneas relativamente à lenhina e possuem mais unidades do tipo G. A lenhina predominante das folhosas é do tipo S/G (Rowell, 2005).

A lenhina da *E. globulus* possui um elevado teor de ligações do tipo β -O-4' com grupo éter, álcool ou cetona em Ca. As ligações α -O-4' não cíclicas localizam-se essencialmente em estruturas do tipo β -O-4'. As ligações β - β' , encontra-se em estruturas cíclicas do tipo pinoresinol e seringaresinol, representando o segundo tipo de ligações mais abundante na lenhina. O teor de estruturas do tipo fenilcumarano (ligações β -5') e de tipo bifênilo (5-5') aparecem apenas com uma frequência baixa. Na Figura 2 encontram-se representados os principais tipos de estruturas e ligações entre monómeros da lenhina de *E. globulus* (Neto & Evtyugin, 2004).

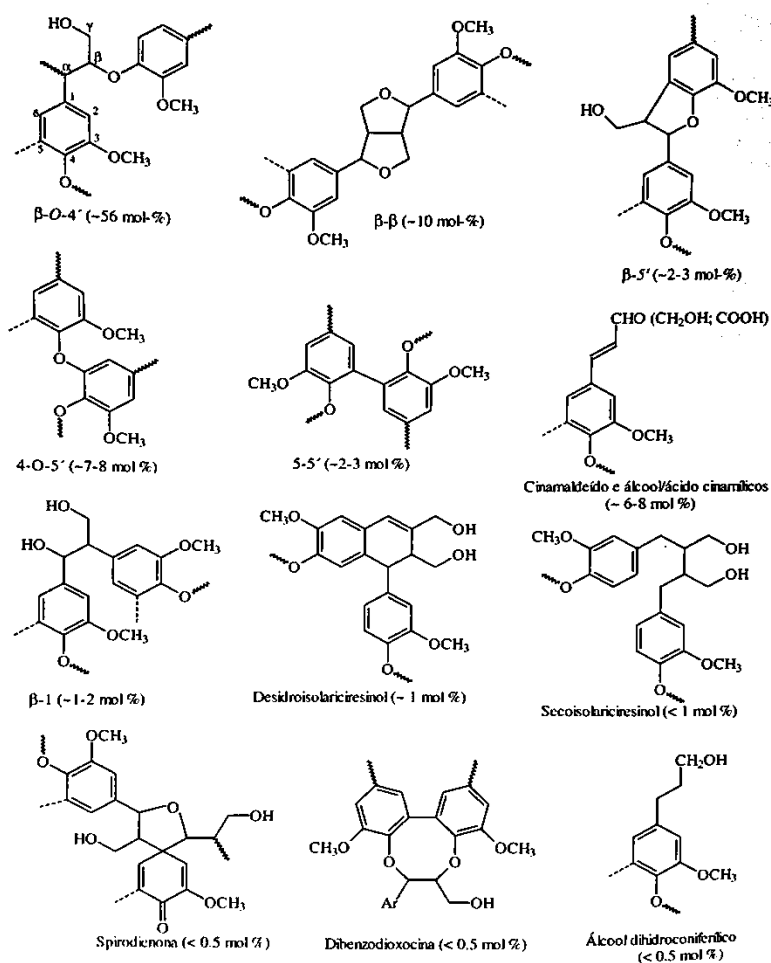


FIGURA 2 - PRINCIPAIS TIPOS DE LIGAÇÕES ENTRE MONÓMEROS IDENTIFICADOS NA LENHINA DE *E. GLOBULUS* (NETO & EVTYUGIN, 2004).

2.1.4 Extratáveis

Os extratáveis são compostos de baixo ou médio peso molecular presentes na madeira em pequenas quantidades. Estes incluem ácidos gordos, pectinas, ácidos resinico, terpenos e cera. (Shiraishi & Hon, 2001)

A composição química da madeira, bem como o teor dos monossacarídeos neutros da madeira do *E. globulus* encontram-se resumidos nas Tabelas 1 e 2 (Evtugin & Neto, 2007; Pinto, Evtugin, & Neto, 2005).

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MADEIRA *E. GLOBULUS*, % EM PESO. (ADAPTADO) (EVTUGUIN & NETO, 2007)

<i>Principais componentes químicos</i>	<i>% em peso p/p (w/w)</i>
Lenhina (Klason)	20,5
Celulose (Kurschner-Hoffer)	50,0
Pentosanas	14,1
Extratáveis (EtOH/tol.; 2:1, v/v)	1,72
Cinzas	0,17

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MONOSSACARÍDEOS DA MADEIRA DO *E. GLOBULUS* (ADAPTADO). (PINTO, EVTYUGIN, & NETO, 2005)

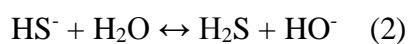
<i>Monossacarídeos</i>	<i>%</i>
Glucose	53,4
Xilanose	14,2
Ramnose	0,3
Arabinose	0,4
Manose	1,1
Galactose	1,5

2.2 Produção de pasta pelo método *kraft*.

O cozimento *kraft* desenvolveu-se como o principal processo de cozimento, sendo o processo mais utilizado mundialmente nas indústrias de produção de pastas celulósicas químicas a partir da madeira., o que representa 89% das pastas químicas e por mais de 62% de todo o material de fibra virgem. Em comparação, apenas 5,3% da produção mundial de pasta química é obtida pelo processo de sulfito. O processo soda, usando solução aquosa de hidróxido de sódio, como licor de cozedura, é utilizado principalmente para a produção de pasta de plantas anuais e, em combinação com pequenas quantidades de antraquinona (ca. de 0,05% na madeira), também para a produção de pasta de folhosas (Ek, Gellerstedt, & Henriksson, 2009).

O principal objetivo do cozimento da madeira é libertar fibras, o que pode ser conseguido química ou mecanicamente ou mesmo pela combinação destes dois tipos de tratamento (Sjostrom, 1993). A lenhina é o que mantém as fibras todas unidas na matriz da madeira. O principal objetivo do cozimento é separar essas fibras umas das outras, mais conhecido por deslignificar a madeira. Este processo envolve a degradação e dissolução das moléculas de lenhina. Existem diferentes tipos de cozimentos químicos que dependem dos reagentes de cozimento usados. (Ek, Gellerstedt, & Henriksson, 2009)

As aparas de madeira são tratadas com uma solução aquosa alcalina constituída essencialmente por hidróxido de sódio ($NaOH$) e sulfureto de sódio (Na_2S) a altas temperaturas (150 – 170 °C) durante 1 – 2 horas, e pH entre 12 – 14. O ião hidróxido (OH^-) e o ião hidrogenossulfito (HS^-) atuam como espécies ativas no cozimento do processo de deslignificação. A tarefa do hidrogenossulfito é deslignificar a pasta enquanto o hidrogénio mantém os fragmentos de lenhina em solução (Ek, Gellerstedt, & Henriksson, 2009) (Lisboa, Evtyugin, Pascoal Neto, & Goodfellow, 2005). A carga de cada substância química é normalmente expressa numa base de madeira como álcali efetivo e sulfidez, tendo em conta o $NaOH$ e o Na_2S , respectivamente. O sulfureto de sódio hidrolisa de acordo com duas equações de equilíbrio (equações (1) e (2)) (Hon, 2007; Sjostrom, 1993).



O processo é normalmente dividido em três fases cinéticas distintas e consecutivas (Ek, Gellerstedt, & Henriksson, 2009) (Pinto, Evtyugin, & Neto, 2005; Lisboa, Evtyugin, Pascoal Neto, & Goodfellow, 2005).

- i. A fase inicial da deslignificação corresponde à fase de aquecimento do reator e é caracterizada pela baixa velocidade de degradação de lenhina onde ocorre cerca de 20 – 30% da deslignificação. Nesta fase ocorre dissolução da maior parte das moléculas de lenhina de baixo peso molecular e degradação parcial da celulose, hemicelulose e pectinas por hidrólise alcalina e pela β – eliminação do terminal redutor da lenhina; é um processo controlado por difusão e ocorre abaixo dos 140°C.
- ii. Segue-se a fase de *bulk*. Nesta fase a velocidade de deslignificação passa a ser controlada por reações químicas e aumenta com o aumento da temperatura. A velocidade de dissolução da lenhina mantém-se elevada durante a fase de deslignificação *bulk* até que cerca de 90% da lenhina tenha sido removida e ocorre entre os 140 – 150 °C.
- iii. A fase final é mais lenta e designa-se por deslignificação residual.

As propriedades físicas e a composição química de pastas alcalinas dependem da espécie de madeira e das condições de cozimento. A composição química da pasta é um fator básico que afeta o rendimento da pasta, o seu comportamento durante outros processos, como o branqueamento, e também as propriedades de resistência e a cor da pasta. As pastas resultantes do processo de cozimento *kraft* são caracterizadas por uma cor muito escura, resultante dos grupos cromóforos existentes na lenhina residual formada durante o cozimento e atendendo à excelentes propriedades de resistência e fibra curta, são mais usadas para produzir cartão, sacos de papel ou papel de embrulho, no caso de a matéria-prima ser madeira de folhosas. (Fengel & Wegener, 1984)

A maior retenção de xilanas durante o cozimento kraft das madeiras de *Eucalyptus*, e, em particular, de *E. globulus*, é atribuída à sua estrutura peculiar, contendo unidades de ácido urónico substituídas em O-2, ligadas a outros polissacarídeos na parede celular (Neto C. , Evtyugin, Pinto, Silvestre, & Freire). Ao longo do processo de deslignificação as xilanas são eliminadas gradualmente atingindo um grau de retenção na pasta no final do cozimento sempre superior a 50%. Este valor de grau de retenção pode

ser justificado pela ligação de glucuronoxilana a outros polissacarídeos nas paredes celulares. Durante o cozimento cerca de 55% dos grupos de ácidos urónicos são degradados ou eliminados das cadeias de xilanas remanescentes na pasta, sendo o MeGlc₄A terminal mais lábil do que o correspondente ácido substituído em O-2. Verifica-se que a massa molecular ponderada das xilanas diminui ao longo do cozimento reduzindo para metade no final do cozimento atingindo valores próximos dos 16 kDa (Neto & Evtugin, 2004). A composição química da pasta *kraft* do *E. globulus* encontra-se resumida na Tabela 3. (Evtugin & Neto, 2007).

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PASTA NÃO BRANQUEADA KRAFT DO *E. GLOBULUS* (KAPPA 16-19) (EVTUGIN & NETO, 2007)

<i>Componentes da pasta</i>	<i>% (base madeira)</i>
Lenhina de Klason	1,3
Glucose	45,0
Xilose	10,6
Ramnose	0,1
Arabinose	0,1
Manose	0,1
Galactose	0,4
Ácidos urónicos	4,5

2.3 Branqueamento de pastas.

A coloração escura da pasta kraft resulta da presença de lenhina residual que se mantém na pasta devido ao seu elevado peso molecular, natureza hidrofóbica e ligações químicas com hidratos de carbono. Devido à sua coloração a lenhina residual deve ser removida da pasta. O principal objetivo do branqueamento é aumentar o grau de brancura da pasta crua. Para além da lenhina outros compostos, como por exemplo as polioses, podem ser parcialmente removidos durante o processo (Sjostrom, 1993; Fengel & Wegener, 1984).

O branqueamento é realizado através da descoloração recorrendo a agentes oxidantes ou redutores. Um determinante crítico na escolha do químico de branqueamento é a seletividade do agente, ou seja, a capacidade de atacar quimicamente a lenhina enquanto danifica minimamente as fibras de celulose. A pasta crua contém elevados níveis de lenhina e, portanto, podem ser utilizados agentes químicos menos seletivos, como por exemplo o oxigénio ou o cloro. O dióxido de cloro e o peróxido de hidrogénio são extremamente seletivos, e reage rapidamente com a lenhina afetando minimamente a celulose. Os químicos extremamente seletivos são utilizados nos estágios finais do branqueamento onde o teor de lenhina é baixo e a celulose está mais suscetível à degradação. O hidrogenossulfito de sódio, agente redutor, e o peróxido de hidrogénio são utilizados no branqueamento de pastas mecânicas ricas em lenhina (U.S. Congress, 1989).

Uma combinação de tratamentos de branqueamento e extração são normalmente utilizados no branqueamento de pastas químicas. Os agentes utilizados assim como a ordem na qual são utilizados determinam a sequência de branqueamento. As sequências geralmente contêm duas fases: o segmento correspondente à deslinhificação que tem como função a remoção da lenhina, e o segmento de branqueamento, que tem como objetivo aumentar a brancura da pasta. O branqueamento pode ser isento de cloro elementar – ECF – recorrendo a compostos clorados, ou totalmente isentos de cloro – TCF. Neste tipo de branqueamento são usados como agentes de branqueamento o oxigénio (*O*), o peróxido de hidrogénio (*P*) e ozono (*Z*) (Fengel & Wegener, 1984) (U.S. Congress, 1989). Em Portugal, a sequência de branqueamento de pasta de *E. globulus* é a DEDED, onde D corresponde a uma fase com dióxido de cloro e E corresponde à fase

de extração alcalina com NaOH. Variantes do esquema referido anteriormente são utilizadas pelo grupo Portucel Soporcel em Portugal, como por exemplo as sequências DEpDED (Setúbal), DEopDED (Figueira da Foz) e DEpDD (Cacia), onde Ep corresponde à extração com peróxido de hidrogénio e Eop corresponde à extração com oxigénio e peróxido de hidrogénio.

Nas reações de branqueamento, além de despolimerização oxidativa, os polissacarídeos sofrem reações de peeling, que consiste no ataque e remoção de unidades das extremidades das cadeias que resulta na redução do tamanho das cadeias e consequentemente a redução do peso molecular das mesmas. A aptidão ao branqueamento está relacionada também com a abundância relativa de estruturas $\beta - O - 4$ das lenhinas das pastas *kraft*. As menores cargas de químicos no cozimento e no branqueamento, requeridas pelo *E. globulus* são explicadas pela elevada proporção de unidades seringilo, baixo grau de condensação e superior teor de estruturas $\beta - O - 4$ (particularmente nas pastas cruas) nas suas lenhinas (Neto C. , Evtugin, Pinto, Silvestre, & Freire; Hart & Rudie, 2012).

2.4 Isolamento de xilanas

As hemiceluloses podem ser isoladas a partir da madeira, holocelulose ou pasta através da realização de extrações. Entre alguns solventes neutros eficazes, o dimetilsulfóxido é particularmente útil na extração de xilanas a partir das holoceluloses apresentando a vantagem de não provocar qualquer alteração química na estrutura das xilanas. Outros métodos de isolamento consistem na realização de extrações recorrendo a soluções alcalinas, como o NaOH e o KOH, no entanto, apresentam a desvantagem de deacetilar por completo as hemiceluloses, no caso do KOH não é possível regenerar quando incorporado no processo de produção de pasta e papel, ao contrário do NaOH. De forma a isolar por completo as xilanas dos restantes polissacarídeos são realizadas precipitações recorrendo a ácidos, como o ácido acético ou sulfúrico, ou a solventes orgânicos, como o álcool etílico (Sjostrom, 1993).

Neste sentido, ainda não foram publicados trabalhos relativos à extração alcalina de xilanas a partir de pasta branca kraft. Atualmente, a otimização do método de extração encontra-se a ser estudado pela aluna Teresa Gomes da Universidade de Aveiro no âmbito da sua tese de mestrado em Química (Gomes, 2014). Segundo o seu estudo foi

determinado o teor de pentosanas extraídas para diferentes concentrações de *NaOH* (Figura 3). De seguida, para uma dada concentração de *NaOH* definida, estudou a cinética do processo, ou seja, o teor de pentosanas extraído ao longo do tempo (Figura 4).

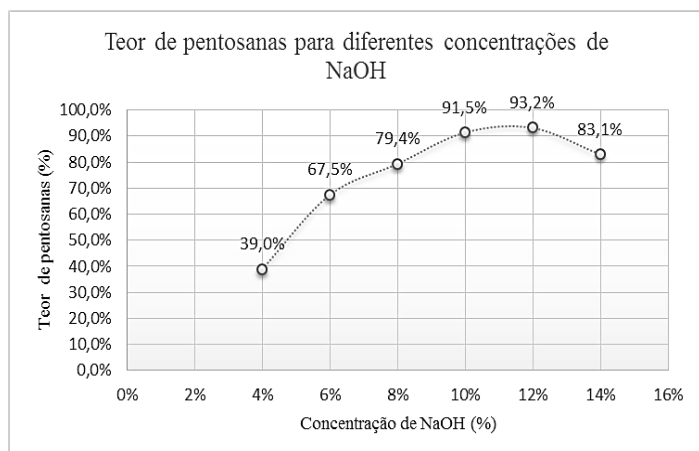


FIGURA 3 - TEOR DE PENTOSANAS EXTRAÍDAS PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *NaOH*. (ADAPTADO DE GOMES, 2014)

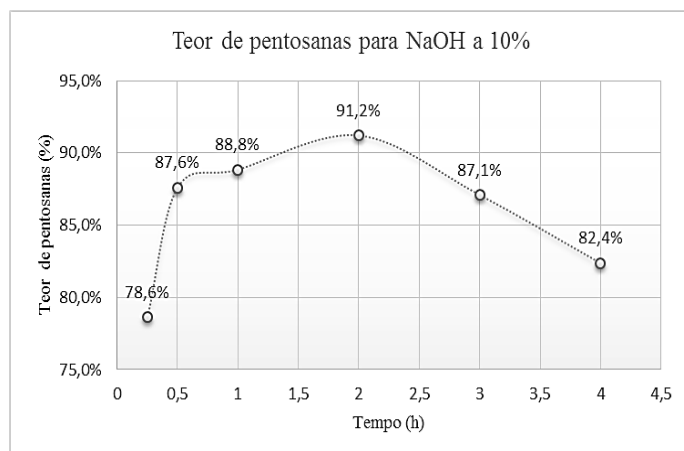


FIGURA 4 – TEOR DE PENTOSANAS EXTRAÍDAS COM *NaOH* A 10% AO LONGO DO TEMPO (ADAPTADO DE GOMES, 2014).

Conclusões retiradas do trabalho realizado e tendo em conta o ponto de vista industrial, em que se pretende obter produtos de igual ou melhor qualidade a custos menores, as extrações de xilanas foram realizadas com *NaOH* a 10% durante 1 hora.

2.5 Modificação de Xilanas.

O esgotamento gradual e o aumento do preço dos produtos petroquímicos assim como a preocupação crescente com questões ambientais e sociais são fatores que têm promovido o desenvolvimento de novos meios de processamento para a produção de materiais a partir de polímeros naturais. Neste cenário, a necessidade de recorrer a polímeros biodegradáveis, renováveis e não alimentares, tais como a celulose e hemiceluloses, tornou-se fundamental para a produção de novos produtos. (Petzold-Welcke, Schwikal, Daus, & Heinze, 2014; Alekhina, Mikkonen, Alen, Tenkanen, & Sixta, 2014).

A hemicelulose xilana é um dos biopolímeros mais abundantes presentes nas madeiras de folhosas. Devido às propriedades funcionais das xilanas naturais, vários campos de aplicação foram considerados, dependendo da relação estrutura-propriedade. (Petzold-Welcke, Schwikal, Daus, & Heinze, 2014)

Dependendo do grau de substituição (DS) e da distribuição dos substituintes, os derivados das xilanas apresentam propriedades diferentes o que leva a um leque diferenciado de possíveis aplicações a explorar em áreas tão distintas como sistemas de embalagens alimentares, revestimento para papel *offset*, hidrogéis, nutrição, cosmética e farmacêutica (Alekhina, Mikkonen, Alen, Tenkanen, & Sixta, 2014; Petzold-Welcke, Schwikal, Daus, & Heinze, 2014).

Devido à sua elevada pureza e brancura, as xilanas isoladas através da extração alcalina têm sido estudadas para utilizações industriais alternativas às convencionais. A partir da sua modificação química, múltiplas funções podem ser introduzidas na cadeia polimérica (Petzold-Welcke, Schwikal, Daus, & Heinze, 2014).

Estudos na modificação química de polissacarídeos têm vindo a surgir com grande ênfase sendo um deles a modificação química dos polissacarídeos por *crosslinking* recorrendo a carbodiimidas em meio aquoso. Desde a sua primeira síntese a partir de tioureias, as carbodiimidas têm vindo a ser usadas em sínteses orgânicas e biotecnológicas. Para além da modificação de polissacarídeos as carbodiimidas também são utilizadas para sínteses peptídicas e modificação de proteínas em meios aquosos (Nakajima & Ikada, 1995).

Vários estudos realizados utilizam carbodiimidas solúveis em água uma vez que estas não se ligam diretamente aos polissacarídeos, como ocorre com os agentes de *crosslinking* convencionais, mas sim aos grupos hidroxilos e carboxílicos dos mesmos (Tomihata & Ikada, 1997).

Nas reações de modificação de polissacarídeos a carbodiimida funciona como um agente que ativa os grupos carboxílicos dos ácidos urónicos que posteriormente reagem com um agente-ligante, normalmente uma amina (Liu, Liu, Wang, Du, & Chen, 2007; López-Alonso, et al., 2009), estabelecendo assim ligações entre moléculas de polissacarídeos e consequentemente levando a um aumento do peso molecular dos mesmos, alterando assim as suas propriedades físicas e químicas.

3 Procedimento Experimental

Foi fornecida uma amostra de pasta kraft branqueada de *E. globulus* proveniente da fábrica da Portucel localizada em Cacia. A pasta branqueada foi tratada num refinador cónico Escher Wiss RL1 (SEL 1Ws/m, 120kWh/t) até atingir 72°SR, e posteriormente foi filtrada num funil de Buckner de modo a remover o excesso de água até teor de secura da pasta de 17,4%.

Neste capítulo serão abordados todos os procedimentos experimentais realizados ao longo do trabalho. Inicialmente será abordada a determinação do teor de xilanas seguida da descrição detalhada de todos os procedimentos realizados na fase de extração e isolamento de xilanas. Serão abordadas as técnicas de caracterização utilizadas, tais como GPC, GC, TGA, FTIR, ¹H RMN e ¹³C RMN, e por fim os procedimentos relativos à modificação das xilanas com o objetivo de aumentar a sua massa molecular média ponderal.

3.1 Determinação do teor de pentosanas.

O teor de xilanas numa pasta indica a retenção ou perda das hemiceluloses durante o cozimento e o branqueamento.

O teor de xilanas na pasta branqueada foi realizado segundo o procedimento descrito nas normas TAPPI 223,257 e 264. O método utilizado baseou-se na ação de ácido clorídrico a 13% fervente sobre as pentosanas, hidrolisando-as e convertendo-as em furfural. O furfural gerado é recolhido com o destilado e doseado colorimetricamente com o reagente orcinol-cloreto férrico.

Numa primeira fase foi necessário realizar a preparação da amostra de modo a que a reação ocorresse de forma uniforme em toda a amostra. Uma amostra da pasta fornecida foi triturada e 1,0 g foram transferidos para um balão de fundo redondo. À amostra foram adicionados 20 g de NaCl e 100 mL de HCl a 13%. A amostra foi submetida a uma destilação até serem obtidos 225 mL de destilado. Ao longo da recolha do destilado, HCl a 13% era adicionado ao balão de destilação. O destilado foi transferido

para um balão de diluição de 250 mL, perfazendo o volume com HCl a 13%. Posteriormente, foram pipetados 5mL de destilado diluído para balões de diluição de 50 mL aos quais se adicionou 25 mL de reagente orcinol. Após 60 minutos, adicionou-se etanol até perfazer o volume de 50 mL e deixou-se reagir durante 60 minutos. De seguida mediu-se a densidade ótica da solução a 630 nm. A comparação do ensaio de cada amostra foi realizada utilizando um branco constituído por 5 mL de HCl a 13% em vez do destilado e sujeito a um tratamento igual para o desenvolvimento da cor.

3.2 Extração e isolamento de xilanas.

Foram realizadas quatro extrações, designadas Extrações 1, 2, 3 e 4, respetivamente. Em cada extração foi utilizada pasta branca numa quantidade equivalente a 50 g de pasta seca, com NaOH com pureza 98%, borohidreto de sódio, para prevenir oxidação dos componentes da pasta, e água destilada.

Misturaram-se os reagentes e dissolveram-se com parte da água previamente pesada. Após diminuição da temperatura da mistura adicionou-se à pasta branqueada. Nesta fase deu-se início à contagem do tempo de extração (1 hora). De seguida homogeneizou-se de imediato a mistura com um desintegrador laboratorial. Adicionou-se a restante água e colocou-se o copo de extração num banho a 25°C. No decorrer da reação a mistura sofreu agitação mecânica caracterizada por duas pás perpendiculares e em série a 200 rpm (Figura 5).



FIGURA 5 - ESQUEMA DE MONTAGEM DA EXTRAÇÃO ALCALINA

Decorrido o tempo de extração, removeu-se o copo do banho e procedeu-se à filtração, assistida a vácuo, da mistura utilizando um funil de Buckner de 4L e placa

porosa G3. Neutralizou-se a pasta a $pH \sim 7$ com lavagens sucessivas com água destilada. Entre lavagens foi sempre feita a desintegração da pasta.

O isolamento das xilanas consistiu numa neutralização do filtrado a $pH \sim 7$ usando ácido sulfúrico ocorrendo a precipitação das xilanas. A neutralização foi controlada recorrendo a um elétrico. Ao longo da neutralização observou-se a alteração de transparência e tonalidade da solução (Figura 6). Seguidamente, o precipitado foi guardado num ambiente frio ($0 - 4^{\circ}C$) durante 12 horas.



FIGURA 6 - MUDANÇAS OBSERVADAS AO LONGO DA NEUTRALIZAÇÃO (MUDANÇA DE COR E FORMAÇÃO DE PRECIPITADO A $pH \sim 12, 10$ e 7 , RESPECTIVAMENTE).

Uma última etapa na fase de isolamento consistiu na lavagem com metanol e centrifugação do precipitado para remoção de água e sais sem que ocorra a dissolução das xilanas. O tempo de centrifugação foi o necessário para ocorrer a sedimentação das partículas ($\sim 15 - 20$ min) a 3300 rpm . Separou-se o excesso do sobrenadante e centrifugou-se o precipitado (Figura 7). O procedimento de lavagem/centrifugação foi repetido três vezes consecutivas.



FIGURA 7 – DA ESQUERDA PARA A DIREITA: CENTRIFUGA; PRECIPITADO DISPERSO; PRECIPITADO CENTRIFUGADO.

Decorrida a etapa de centrifugação procedeu-se à liofilização das amostras. Amostras de xilana foram transferidas para um copo, congeladas e colocadas num liofilizador durante 48 horas (Figura 8). Nesta fase a aplicação de vácuo levou à

diminuição da temperatura de ebulição dos solventes e ocorreu a evaporação dos mesmos. Por fim as amostras foram maceradas e guardadas em tubos de amostras.



FIGURA 8 – DE ESQUERDA PARA A DIREITA: LIOFILIZADOR; AMOSTRA MACERADA; AMOSTRA EM TUBO

3.3 Caracterização das xilanas.

Para a caracterização das xilanas isoladas e modificadas foram realizadas seis técnicas/métodos de caracterização. A determinação da massa molecular foi realizada recorrendo à técnica de cromatografia por permeação em gel (GPC). Os açúcares foram analisados como acetatos de alditol através de cromatografia gasosa (GC). O teor de sais foi determinação através de análise termogravimétrica. A determinação das unidades estruturais constituintes das amostras de xilanas isoladas e modificadas foi realizada através da análise de ressonância magnéticas de protão (^1H RMN) e carbono-13 (^{13}C RMN) e por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

3.3.1 Cromatografia por permeação em gel (GPC).

A Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) é uma técnica cromatográfica que separa moléculas dissolvidas com base no seu tamanho, bombeando-as através de colunas especializadas que contém no seu interior um material microporoso.

- Preparação do eluente (DMA 0.1): $8,4865 \pm 0,0001$ g de LiCl foram dissolvidos em 2 L de DMA com pureza 99%.
- Preparação do solvente (DMA 8): $4,0036 \pm 0,0001$ g de LiCl foram dissolvidos em 50 mL de DMA com pureza 99%.

- Preparação dos padrões: A 1 – 2 mg de amostras de polulanos com massas moleculares bem definidas foram adicionados 50 μL de DMA 8 e posteriormente foram colocadas numa estufa a 105 °C durante 15 minutos. De seguida adicionou-se às amostras 600 μL de DMA puro. Os padrões de calibração utilizados foram pululanas, polímeros de cadeia linear, com massas moleculares de 5800 Da, 12200 Da, 23700 Da e 48000 Da. Foi utilizada glucose como padrão interno.
- Preparação das amostras: A 5 mg de amostra de xilana isolada ou modificada foram adicionados 60 μL de DMA 8, de modo a inchar toda a amostra através do intumescimento das fibras e posteriormente a sua dissolução, e posteriormente foram colocadas numa estufa a 105 °C durante 60 minutos. De seguida adicionou-se às amostras 600 μL de DMA puro.

Amostras de xilanas isoladas e modificadas foram analisadas num sistema PL – GPC 110 system (Polymer Laboratories Ltd., U.K.) equipado com uma pré-coluna Plgel 10 μm , duas colunas Plgel 10 μm MIXED D 300 x 7.5mm (Polymer Laboratories) em série e um detetor de índice de refração. As colunas, e o sistema de injeção e o detetor foram mantidos a 70°C. O eluente utilizado foi DMA contendo 0,1M de LiCl com um fluxo de 0,9 mL/min. A calibração das colunas foi realizada recorrendo aos padrões de pululanas com massas moleculares médias ponderadas bem conhecidas (2,0 – 48,0 kDa).

3.3.2 Cromatografia gasosa (GC).

Açúcares monoméricos foram analisados como acetatos de alditol por cromatografia gasosa. As amostras foram hidrolisada com o objetivo de quebrar as ligações glicosídicas e obter cadeias de polímero com menor dimensão. A 10 mg de amostra de xilana isolada adicionou-se 400 μL de H_2SO_4 a 72% e procedeu-se à incubação durante 3 horas a 30°C. Adicionou-se 4,4 mL de água destilada e procedeu-se à sua incubação durante 2h30min a 30°C.

Seguiu-se a etapa de redução por clivagem das ligações glicosídicas com adição de moléculas de água, nesta etapa o objetivo foi remover possíveis impurezas. A cada

amostra adicionou-se 200 μL de 2-desoxiglucose (solução de $\sim 10 \text{ mg/mL}$) como padrão interno – a $0,1003 \pm 0,0001 \text{ g}$ de 2-desoxiglucose adicionou-se 10 mL.

De cada amostra, transferiu-se 1 mL de hidrolisado para novos tubos e adicionou-se 0,2 mL de NH_3 a 25% e 0,1 mL de NH_3 a 3M contendo 150 mg/mL de NaBH_4 , em gelo, e levou-se a incubar durante 1 hora a 30°C . Arrefeceu-se as amostras em gelo e adicionou-se $2 \times 50 \mu\text{L}$ de ácido acético glacial e agitou-se no vortex.

Na última etapa, correspondente à acetilação. De cada amostra, transferiu-se 0,3 mL para novos tubos de *sovirel* e, em banho de gelo, adicionou-se 0,45 mL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético. As amostras foram a incubar durante 30 min a 30°C . De seguida adicionou-se 3,75 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano. As amostras foram a agitar no vortex e procedeu-se à aspiração da fase aquosa (camada superior). Adicionou-se 3 mL de água destilada e 2 mL de diclorometano e aspirou-se a fase aquosa. Repetiu-se este último procedimento mais três vezes. Posteriormente, cada amostra foi seca com azoto. Finalmente adicionou-se 1 mL de acetona e repetiu-se o processo de evaporação. O procedimento foi repetido uma segunda vez.

Procedeu-se à análise das amostras. Ao resíduo seco obtido adicionou-se 100 μL de acetona. Injetou-se 0,5 μL de amostra no GC e obteve-se o cromatograma de cada amostra. Para cada amostra fizeram-se duas injeções.

As amostras de xilana isolada foram analisadas num cromatógrafo de gás Varian 3350, equipado com coluna capilar DB-225 J&W ($30\text{m} \times 0,25\text{mm}$ i.d., com $0,15\mu\text{m}$ de espessura de filme) e detetor FID, usando N_2 como gás de arraste com as seguintes condições: temperatura do injetor 225°C , temperatura da coluna 220°C e temperatura do detetor 250°C .

3.3.3 Ressonância Magnética Nuclear de protão (^1H RMN).

A 5 mg de xilanas isoladas e modificadas foram adicionados 0,7 mL de D_2O e uma quantidade muito pequena de TMSP, que é um padrão para análise RMN.

As amostras de xilanas isoladas e modificadas foram analisadas por ^1H RMN em D_2O a 303 K num espectrómetro de RMN FT Bruker AVANCE 300 a operar a

300,13 MHz. Os parâmetros de aquisição foram: 12,2 μ s com comprimento de pulso (90°) com 15 s de atraso e 300 scans.

3.3.4 Ressonância magnética nuclear com carbono-13 (^{13}C RMN).

Amostras de xilanas isoladas e modificadas foram analisadas em estado sólido.

O equipamento utilizado foi um espectrómetro de RMN BRUKER AVANCE 400, com um campo magnético estático de 9,4 T. As amostras foram colocadas num rotor de zircónia seladas com tampas de Kel-FTM e colocadas em rotação a 9 kHz. Os parâmetros de aquisição usados foram os seguintes: pulso de prótons 90° (4 μ s), tempo de contacto de 2 ms, atraso de 4 s e 2000 scans.

3.3.5 Análise Termogravimétrica (TGA).

As xilanas isoladas e modificadas foram analisadas por termogravimetria. O equipamento utilizado foi um SETSYS Evolution 1750 da Setaram. Foram medidas 20 – 30 mg de cada uma das amostras. Estas foram analisadas numa gama de temperaturas compreendida entre 25 – 600 $^\circ\text{C}$ com velocidade de aquecimento de 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ de numa atmosfera de O_2 .

3.3.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Amostras de xilanas modificadas foram preparadas com KBr numa proporção de 2:200, e foram prensadas num pastilhador a 80 mPa durante aproximadamente 3 minutos. Os espectros de FTIR das amostras foram adquiridos num espectrofotómetro Mattson 7000 FTIR, com uma resolução de 4,0 cm^{-1} e 128 scans, registados na região do infravermelho médio, que se estende no intervalo 4000 – 400 cm^{-1} .

3.4 Modificação das xilanas

3.4.1 Modificação de xilanas por reação ADH na presença de EDC, em água.

A metódica de modificação de xilanas foi realizada de acordo com o documento científico previamente realizado por Tejano *et al* (2011). As amostras utilizadas para realização da modificação foram correspondentes às Extrações 1 (xyl₁) e 3 (xyl₃). A xyl₃ foi previamente sujeita a uma diálise.

A reações de modificação foram realizadas nas seguintes condições: à amostra de xilana foram adicionados 20 mL de água destilada. Adicionou-se às misturas EDC e depois o ADH, realizou-se o ajuste do pH e deixou-se reagir durante a noite à temperatura ambiente (20°C) sob agitação magnética. Foram feitos dois ensaios com a amostra da extração 1 com ajustes de pH diferentes, a uma das misturas ajustou-se o pH a 7 (1.1A) e a outra ajustou-se o pH a 4,5 (1.2 A), e outros dois ensaios com a amostra da extração 3 dialisada com proporções molares diferentes, com proporção dos grupos COOH:EDC:ADH iguais a 1: 5: 4 (3.1 A) e 1: 2,5: 2 (3.2 A). O ajuste do pH foi feito utilizando uma solução de HCl a 0,5M previamente preparada e recorrendo a papel indicador e um elétrico. Na Tabela 4 encontram-se as condições usadas para cada uma das modificações.

TABELA 4 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS UTILIZADAS NA MODIFICAÇÃO COM EDC/ADH.

	$m_{xyl} \pm 0,0001(g)$	$m_{EDC} \pm 0,0001(g)$	$m_{ADH} \pm 0,0001(g)$	pH
1.1 A	0,5062	0,1347	0,0968	7,05
1.2 A	0,5070	0,1346	0,0965	4,55
3.1 A	0,3628	0,1914	0,1366	5,50
3.2 A	0,3628	0,0957	0,0683	5,25

Após o tempo de reação foi adicionado à mistura acetona de forma a precipitar a xilana modificada. De seguida foi feita a centrifugação do precipitado. O tempo de centrifugação foi o necessário para ocorrer a sedimentação das partículas (8 min) a 4000 *rpm*. Separou-se o sobrenadante do precipitado. Lavou-se parte do precipitado com metanol, para remoção de algumas impurezas tais como sais e água e garantir a não dissolução das xilanas. Centrifugou-se novamente e separou-se a fase líquida da sólida, e outra parte do precipitado adicionou-se 40 *mL* de água destilada e aqueceu-se a 70°C sob agitação magnética para testar a solubilidade da xilana modificada em água. O procedimento de lavagem/centrifugação foi repetido três vezes consecutivas. De seguida a amostra lavada foi a liofilizar.

3.4.2 Modificação de xilanas por reação com ADH na presença de formaldeído, em DMSO.

Foram realizados dois ensaios. O primeiro foi realizado com uma amostra de xyl₁ e o segundo com uma amostra de xyl₃ dialisada. A reação de modificação foi realizada nas seguintes condições: a 1 *g* de xyl₁ (1B) e 0,4 *g* de xyl₃ dialisada (3B) foram adicionados 40 *mL* de DMSO e deixou-se reagir durante hora e meia a 80°C. Borbulhou-se a mistura com formaldeído no estado gasoso a 130°C durante 15 minutos. Deixou-se arrefecer, adicionou-se 100 *mg* de ADH e deixou-se reagir à temperatura ambiente durante 1 hora sob agitação magnética. Ajustou-se o *pH* ~ 5 com ácido fórmico e deixou-se a reagir durante a noite. Na Tabela 5 encontram-se as condições usadas para cada uma das modificações.

TABELA 5 – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS UTILIZADAS NA MODIFICAÇÃO DE XILANAS NUM SISTEMA FORMALDEÍDO/ADH.

	$m_{xyl} \pm 0,0001(g)$	$m_{ADH} \pm 0,0001(g)$	<i>pH</i>
<i>1B</i>	1,0830	0,1026	5
<i>3B</i>	0,4030	0,1002	5

Após o tempo de reação foi adicionado à mistura acetona de forma a precipitar a xilana modificada. De seguida foi feita a centrifugação do precipitado. O tempo de centrifugação foi o necessário para ocorrer a sedimentação das partículas (8 min) a 4000 *rpm*. Separou-se o sobrenadante do precipitado. Lavou-se parte do precipitado com metanol, para remoção de algumas impurezas tais como sais e água e garantir a não dissolução das xilanas, centrifugou-se novamente e separou-se a fase líquida da sólida, e outra parte do precipitado adicionou-se 40 *mL* de água destilada e aqueceu-se a 70°C sob agitação magnética para testar a solubilidade da xilana modificada em água. O procedimento de lavagem/centrifugação foi repetido três vezes consecutivas. De seguida a amostra lavada foi a liofilizar.

3.4.3 Modificação de xilanas por reação com diaminoureia na presença de formaldeído, em DMSO.

Foi realizado um único ensaio com uma amostra de xyl₃ dialisada. A reação de modificação foi realizada nas seguintes condições: a 0,5025 ± 0,0001 *g* de xyl₃ (3C) foram adicionados 20 *mL* de DMSO e deixou-se reagir durante hora e meia a 80°C. Borbulhou-se a mistura com formaldeído no estado gasoso a 130°C durante 15 minutos. Deixou-se arrefecer, adicionou-se 0,0534 ± 0,0001 *g* de diaminoureia e deixou-se reagir à temperatura ambiente durante 1 hora sob agitação magnética. Ajustou-se o *pH* ~ 5 com ácido fórmico e deixou-se a reagir durante a noite. Após o tempo de reação foi adicionado à mistura acetona de forma a precipitar a xilana modificada. De seguida foi feita a centrifugação do precipitado. O tempo de centrifugação foi o necessário para ocorrer a sedimentação das partículas (8 min) a 4000 *rpm*. Separou-se o sobrenadante do precipitado. Lavou-se parte do precipitado com metanol, para remoção de algumas impurezas tais como sais e água e garantir a não dissolução das xilanas, centrifugou-se novamente e separou-se a fase líquida da sólida, e outra parte do precipitado adicionou-se 40 *mL* de água destilada e aqueceu-se a 70°C sob agitação magnética para testar a solubilidade da xilana modificada em água. O procedimento de lavagem/centrifugação foi repetido três vezes consecutivas. De seguida a amostra lavada foi a liofilizar.

4 Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos das extrações, modificações e caracterizações químicas das xilanas obtidas e discussão dos mesmos.

4.1 Extração e Isolamento.

A xilana foi isolada a partir de pasta de *E. globulus* branqueada e refinada com um teor inicial de pentosanas de 17,0% (*m/m*). A pasta foi tratada com *NaOH* a 10% durante 1 hora e posteriormente o filtrado foi neutralizado com *H₂SO₄* (*pH* 7,0). Após extração o teor de pentosanas residual na pasta foi 2,0% (*m/m*).

Na Tabela 6 encontram-se resumidos os valores de *pH* exatos finais e massas finais de xilanas isoladas assim como os respectivos rendimentos, tendo em conta que se extraiu a partir do equivalente a 50 g de pasta branqueada seca. Os produtos obtidos foram designados como *Xyl_i*, sendo *i* o número correspondente à extração *i* (*i* = 1 ... 4).

TABELA 6 - VALORES DE *pH*, MASSA FINAL DE XILANA E RENDIMENTO PARA CADA UMA DAS EXTRAÇÕES.

	<i>pH final</i>	<i>m_{xyl}</i> (g)	<i>η</i> (%)
<i>Xyl₁</i>	7,06	14,41	169,5
<i>Xyl₂</i>	7,06	20,19	237,5
<i>Xyl₃</i>	6,53	42,07	494,9
<i>Xyl₄</i>	7,15	17,32	203,8

Seriam de esperar rendimentos na ordem dos 90% (*m/m*) tendo em conta o teor de pentosanas inicial e final da pasta utilizada, o que não se verifica. Esta diferença nos valores é justificada pelo teor de cinzas das amostras analisadas.

As cinzas são material inorgânico presente numa dada amostra. Esse material pode ser composto por sais inorgânicos resultantes da neutralização do extrato de xilana. A sua determinação foi realizada através da análise termogravimétrica.

4.2 Caracterização das xilanas.

Realizadas as extrações procedeu-se assim à análise química da xilana. A partir destas análises podemos determinar rendimento real de xilanas obtidas e caracterizar mais detalhadamente a xilana extraída, determinando a peso molecular, pureza e composição de açúcares neutros.

4.2.1 Análise Termogravimétrica (TGA).

Termogravimetria ou análise termogravimétrica (TGA - do inglês Thermogravimetric analysis) é uma técnica destrutiva no ramo de análises térmicas, na qual se monitoriza a variação da massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo num ambiente a temperatura e atmosfera controladas (Perkinelmer, 2014).

Uma amostra inicial foi sujeita a um aumento gradual ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) de temperatura ($25 - 600^{\circ}\text{C}$), em atmosfera de oxigénio, e foi medida a massa da amostra ao longo do tempo. A Figura 9 apresenta a análise termogravimétrica das amostras de xilanas extraídas.

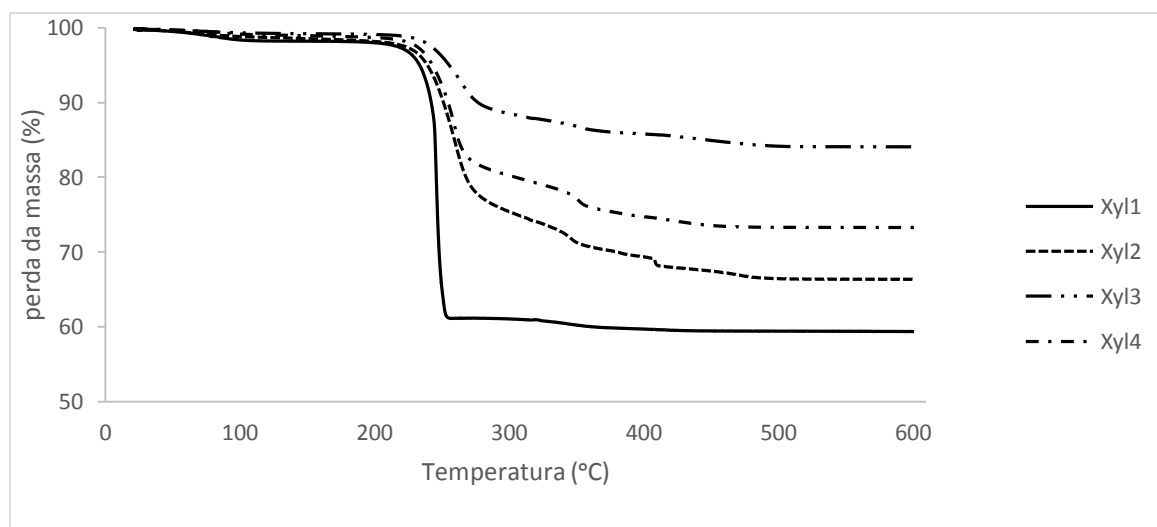


FIGURA 9 - CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICA PARA AS DIFERENTES XILANAS EXTRAÍDAS DA PASTA BRANQUEADA.

Pela observação dos termogramas podemos verificar que as amostras em análise apresentam três fases. O primeiro estágio ocorre perto dos 100°C , correspondente à evaporação de água residual absorvida e compostos voláteis presentes nas amostras. O

segundo estágio ocorreu perto dos 230 – 250°C, estando relacionado com a degradação das cadeias de xilana. O terceiro e último estágio observado perto dos 300 – 400°C que corresponde à carbonização dos produtos em cinzas.

Outra variável que também é relevante neste tipo de caracterização é a massa da amostra. No cromatograma representado na Figura 9 observamos o teor de cinzas em função da temperatura. Observamos que à uma perda de massa de 41%, 34%, 16% e 27% para as amostras Xyl₁, Xyl₂, Xyl₃ e Xyl₄, respetivamente. Esta perda de massa corresponde à percentagem de xilana pura existente em cada uma das amostras, o restante são sais que se formaram no processo de extração e isolamento.

Tendo em conta a análise termogravimétrica e os rendimentos da fase de extração e isolamento podemos concluir que o facto de os rendimentos terem valores tão elevados se deve à presença de impurezas/sais nas amostras. Assim sendo, os rendimentos reais de xilanas foram de 69,5 %, 80,8 %, 79,2 % e 55,0 % para as amostras Xyl₁, Xyl₂, Xyl₃ e Xyl₄, respetivamente.

4.2.2 Pesos moleculares das xilanas.

As xilanas isoladas foram submetidas a cromatografia por permeação em gel. Através desta análise foi possível determinar o peso molecular medio de cada um das xilanas. O cromatograma correspondente a cada uma das amostras encontra-se representado na Figura 10.

As curvas de eluição exibem uma distribuição unimodal Gaussiana da massa molecular, indicando uma homogeneidade estrutural das amostras de xilanas isoladas.

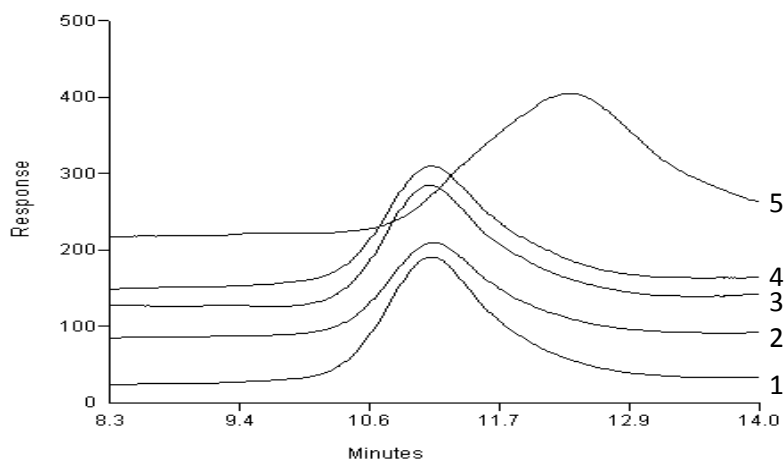


FIGURA 10 – CROMATOGRAMAS; 1, 2, 3 E 4 CORRESPONDEM AS EXTRAÇÕES DE PASTA REFINADA A 72°SR, 5 CORRESPONDE À EXTRAÇÃO DE PASTA REFINADA A 66°SR.

Na Tabela 7 podemos comparar os pesos moleculares médios em massa, os pesos moleculares médios em número e índice de polidispersidade das xilanas isoladas nas várias extrações.

TABELA 7 - PESOS MOLECULARES MÉDIOS EM MASSA E NÚMERO E ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE DAS XILANAS ISOLADAS SOB AS MESMAS CONDIÇÕES.

	Xyl_1	Xyl_2	Xyl_3	Xyl_4	Xyl_5
$\overline{M}_w(Da)$	27500	28200	28100	26300	10400
$\overline{M}_n(Da)$	20900	22000	23600	20000	6800
PD	1,31	1,29	1,19	1,31	1,51

Pela análise da Tabela 7 podemos observar que o produto obtido tem peso molecular médio a variar entre os 26,3 – 28,2 *kDa* (Extrações 1 a 4), o que comprova o anteriormente afirmado quanto à homogeneidade das amostras de polissacarídeos isolados. Este intervalo de valores é menor que o peso molecular médio da xilana na madeira (36 *kDa*) uma vez que as xilanas foram obtidas a partir de pasta crua e branqueada, e não isoladas a partir da madeira (Evtyugin, Tomas, & Silva, 2003).

Quando o pH assume valores baixos a massa molecular da amostra é muito menor (cerca de um terço da massa molar dos produtos obtidos quando o pH é neutro). Este facto deve-se à contínua degradação das cadeias do polímero, ou seja, quebra das ligações glicosídicas entre unidades monoméricas por ação do ácido levando à diminuição do comprimento das cadeias e consequentemente o seu peso molecular. Esta afirmação é

suportada pela análise de uma amostra de xilana isolada a $pH = 1,71$ sob as mesmas condições de extração. Esta xilana apresentou um peso molecular médio de $10,4 \text{ kDa}$, e um índice de polidispersidade igual a 1,51 (Tabela 7; Figura 10, curva 5)

Pela análise do índice de polidispersidade das cadeias podemos verificar que a distribuição de tamanho molecular das cadeias poliméricas não é muito ampla.

4.2.3 Análise de açúcares.

A fração polissacarídea extraída foi caracterizada através da análise dos açúcares neutros das xilanas isoladas. A determinação das percentagens teve em conta a massa do monossacarídeo na amostra (m_{mon}) e a massa total de todos os monossacarídeos presentes na mesma amostra ($m_{\text{t,mon}}$). A Tabela 8 apresenta-nos a composição média em monossacarídeos presentes nas amostras.

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DE MONOSSACARÍDEOS NAS XILANAS ISOLADAS.

<i>Monossacarídeos</i> $\% (m_{\text{mon}}/m_{\text{t,mon}})$	<i>Xyl₁</i>	<i>Xyl₂</i>	<i>Xyl₃</i>	<i>Xyl₄</i>
<i>Ramnose</i>	-	-	-	-
<i>Fucose</i>	-	-	-	-
<i>Ribose</i>	-	-	-	-
<i>Arabinose</i>	$0,6 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,3$
<i>Xilose</i>	$82,1 \pm 16,1$	$88,0 \pm 12,8$	$95,0 \pm 1,1$	$94,5 \pm 0,6$
<i>Manose</i>	-	-	-	$0,1 \pm 0,2$
<i>Galactose</i>	$8,8 \pm 16,6^*$	$0,5 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,1$
<i>Glucose</i>	$8,4 \pm 12,9^*$	$2,1 \pm 1,8$	$2,6 \pm 1,0$	$3,5 \pm 0,4$

*estes valores não foram considerados na discussão dos resultados tendo em conta as suas incongruências.

Pela análise da Tabela 8 verificou-se a presença maioritária de xilose (82 – 95%), como seria de esperar, uma vez que a cadeia principal das xilanas é constituída por moléculas de xilose ligadas por ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$. O segundo monossacarídeo mais abundante é a glucose (2 – 4%) e o terceiro monossacarídeo que se destaca é a galactose (0,4 – 0,6%). Os restantes monossacarídeos como a arabinose, a ramnose e a manose surgem em quantidades vestigiais. Já a fucose e a ribose não foram detetadas. Desta análise é possível mostrar que o polissacarídeo isolado deveria de ser uma xilana com uma pequena contaminação de glucanas. As glucanas podem ter origem

da própria xilana isolada ou de fragmentos de celulose provenientes do processo de extração (β -celulose).

4.2.4 Ressonância Magnética Nuclear de próton (^1H RMN).

A identificação, quantificação e distribuição das unidades estruturais das xilanas isoladas foram determinadas recorrendo a espectroscopia por ^1H RMN. A Figura 11 representa o espectro de ^1H RMN correspondente à Xyl_1 . Os espectros de ressonância magnética das restantes xilanas (Xyl_2 , Xyl_3 e Xyl_4) não se encontram representados por serem todos iguais ao da Xyl_1 .

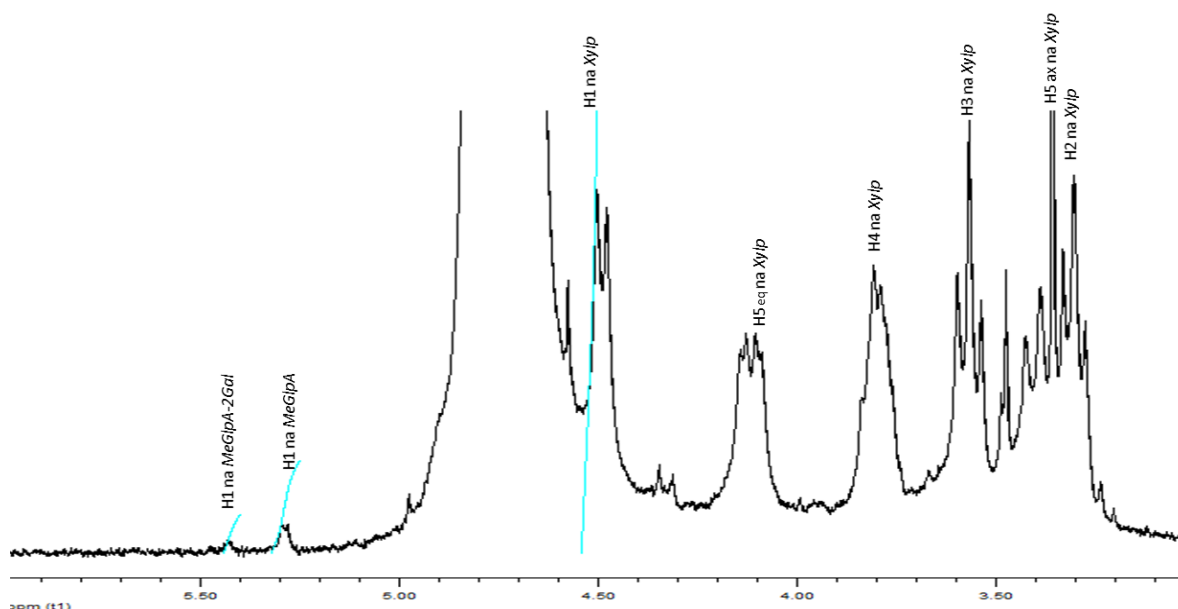


FIGURA 11 - ESPECTRO DE ^1H RMN A 1D DA AMOSTRA XYL_1 EM D_2O .

As ressonâncias de cada amostra de xilana isolada foram analisadas de acordo com dados da literatura (Evtyugin, Tomas, & Silva, 2003). A quantificação dos diferentes grupos estruturais de β -D-Xylp e respectivas ramificações foi realizada de acordo com a metodologia utilizada por Teleman *et al* (2000).

A análise do espectro de ^1H RNM (Figura 10) revelou um grupo de sinais de prótons proeminentes a 4.49, 4.13, 3.81, 3.57, 3.56 e 3.30 ppm atribuídos aos prótons H-1, H-5_{eq}, H-4, H-3, H-5_{ax} e H-2, respetivamente, de resíduos não substituídos de β -D-xilopiranosose ligadas internamente por ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$. Observa-se dois picos menos intensos na região entre 5.28 e 5.42 ppm. O primeiro corresponde ao H-1 do ácido

4 – *O* –metil-D-glucurónico (4OMeGlc_pA), sugerindo que as unidades glucuranosilo são essencialmente metiladas. A ressonância a 5.42 ppm corresponde ao H-1 de ácido 4OMeGlc_pA substituídos no *O*-2 com unidades galatopiranosose (Gal_p) ou glucopiranosose (Glc_p) (Evtugyin, Tomas, & Silva, 2003).

A abundância relativa de cada elemento estrutural da xilana foi determinada através de integração quantitativa do espectro como podemos observar na Figura 10. A Tabela 9 resume os valores obtidos e a designação de cada fragmento estrutural identificado.

TABELA 9 – DESIGNAÇÃO E ABUNDÂNCIA RELATIVA DAS UNIDADES ESTRUTURAIS DA XILANA ISOLADA (XYL_I).

Fragmento estrutural e respetiva designação	Abundância relativa (para 100 unidades de Xyl _p)
→2)-4-O-Me – α -Glc _p A-(1→ (4OMeGlc _p A-2Gal)	2
4-O-Me – α -Glc _p A-(1→ (4OMeGlc _p A)	6
→4)-[β -D – Xyl _p]-(1→ (Xyl _p)	92
Total	100

Pela análise do espectro de ¹H RMN, dos açúcares neutros e da Tabela 9 podemos concluir que as xilanas isoladas a partir da pasta branqueada são (2 – *O* – galactopiranosil – 4 – *O* –metil – α – *D* –glucurono) – *D* – xilanas com uma cadeia principal constituída por β – *D* – xilana ramificada no *O*-2 sendo as cadeias ramificadas constituídas por ácidos 4 – *O* –metilglucurónico e ácidos 4 – *O* –metilglucurónicos substituídos no *O*-2 por α – *D* – galactose. Na Figura 12 encontra-se uma representação esquemática da xilana para 50 unidades estruturais.

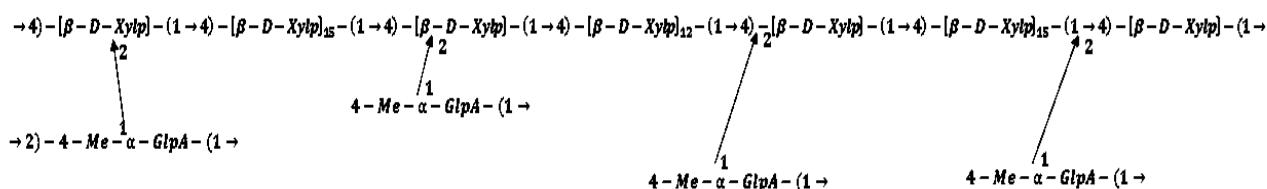


FIGURA 12 - ESTRUTURA POSSÍVEL DA HETEROXILANA CARACTERIZADA.

4.3 Modificação das xilanas.

O objetivo das modificações foi recorrer aos grupos carboxílicos e hidroxilos das xilanas isoladas para implementar ramificações entre cadeias de xilana com a ajuda de agentes de ativação e catalisadores, para no fim aumentar o peso molecular da xilana.

Neste trabalho foram realizadas três modificações diferentes para duas amostras de xilanas. As modificações serão futuramente identificadas como Modificação XY, onde X corresponde à amostra de xilana utilizada onde X=1 ou 3 e Y corresponde à modificação caracterizada pelo sistema utilizado onde Y= A,B ou C.

4.3.1 Modificação A: Modificação de xilanas por reação com ADH na presença de EDC, em água.

A modificação da xilana foi realizada seguindo a metodologia realizada por Tejano *et al* para a modificação de celulose recorrendo a EDC e ADH como reagentes em meio aquoso (Tejano, Antal, & Van de Ven, 2011).

O uso de carbodiimidas para criar intermediários reativos com aminas favorece modificações de proteínas, ácidos nucleicos e compostos moleculares de pequenas dimensões com grupos de ácidos carboxílicos (Maddison & Carnalli, 2013). Muitos dos estudos realizados são baseados na formação de amidas sob condições muito suaves entre ácidos carboxílicos e amidas em sistemas aquosos e orgânicos na presença de carbodiimidas. No entanto, alguns estudos focaram-se na elucidação do mecanismo da formação de amidas, particularmente em sistemas aquosos em vez da sua grande importância na bioconjugação, que se resume na formação de ligações peptídicas entre proteínas (Nakajima & Ikada, 1995; Maddison & Carnalli, 2013).

O EDC é uma carbodiimida solúvel em água e tem a função de agente de ativação devido à sua habilidade bem conhecida de se ligar a grupos urónicos formando derivados de tipo *O*-acilisoureia que posteriormente reagem com aminas (Liu, Liu, Wang, Du, & Chen, 2007). O ADH serviu como agente-ligante entre grupos urónicos da xilana e grupos amina permitindo assim ligar moléculas de xilana entre si (Tejano, Antal, & Van de Ven,

2011). Na Figura 13 encontra-se representado o mecanismo de reação de condensação de ácidos carboxílicos com aminas adaptado do trabalho de Liu *et al* (2007).

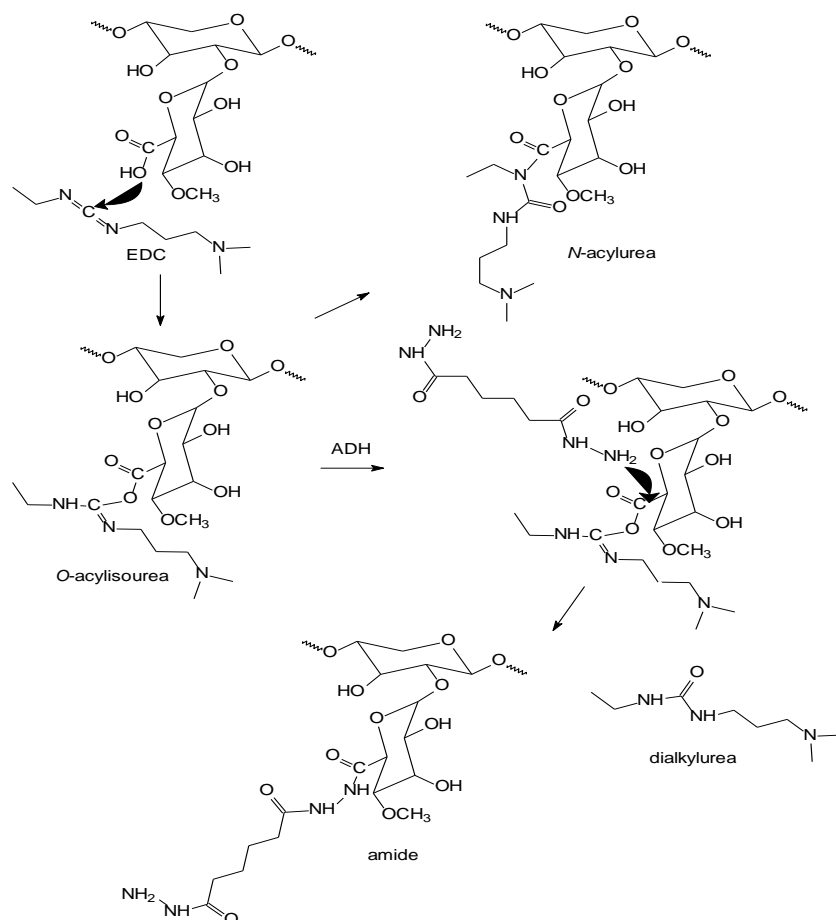


FIGURA 13 - MECANISMO DE REAÇÃO ENTRE GRUPOS URÓNICOS DA XILANA E ADH NA PRESENÇA DE EDC (ADAPTADO DE LIU *ET AL* (2007)).

Como podemos observar da Figura 13, o EDC reage com os grupos urônicos dos ácidos carboxílicos da xilana e forma um intermediário instável designado *O*-acilisourea. Este intermediário, na ausência de nucleófilos, sofre um rearranjo hidrolítico dando origem a um aduto, uma *N*-acilureia. Por outro lado, na presença de nucleófilos, como por exemplo aminas, que no caso em estudo foi o ADH, a formação do intermediário *O*-acilureia é seguida por um ataque nucleofílico, formando uma ligação amídica entre a amina e o ácido, dando origem a uma amida (López-Alonso, et al., 2009; Liu, Liu, Wang, Du, & Chen, 2007).

As condições mais favoráveis para ocorrer a reação do EDC e os grupos urônicos são dependentes do pH, e portanto a reação ocorreu no intervalo de pH entre 4 – 5 (Liu, Liu, Wang, Du, & Chen, 2007; López-Alonso, et al., 2009; Maddison & Carnalli, 2013; Nakajima & Ikada, 1995). Na Figura 14 está apresentada a formação da ligação amidica

entre uma amida e um intermediário *O*-acilisoureira resultando na formação de uma ponte intermolecular. Como subproduto da reação de *crosslinking* surge dialquilureia.

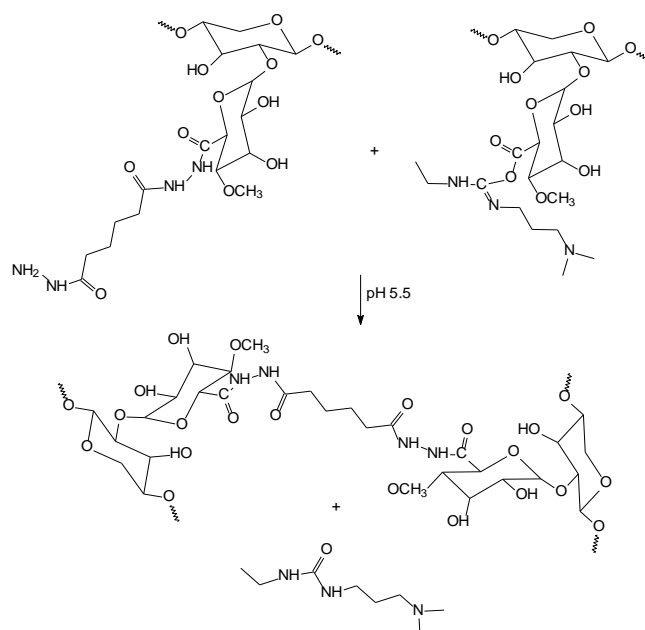


FIGURA 14 – ESQUEMA REACIONAL DA REAÇÃO ENTRE AMIDA E INTERMEDIÁRIO *O*-ACILUREIA (ADAPTADO DE LIU *ET AL* (2007)).

Tendo em conta a aleatoriedade da reação pensa-se que três reações possam ter ocorrido e portanto três produtos finais se possam ter obtido: um dos produtos surgiu devido ao rearranjo dos eletrões dando origem ao aduto *N*-acilureia estável (Figura 15 a.), outro produto resulta da reação entre os grupos urónicos da mesma cadeia de xilana (Figura 15 b.) e o terceiro, que é o produto desejado, resulta na modificação da xilana e formação de pontes intermoleculares entre xilanas, aumentando assim o peso molecular da xilana significativamente (Figura 15 c.).

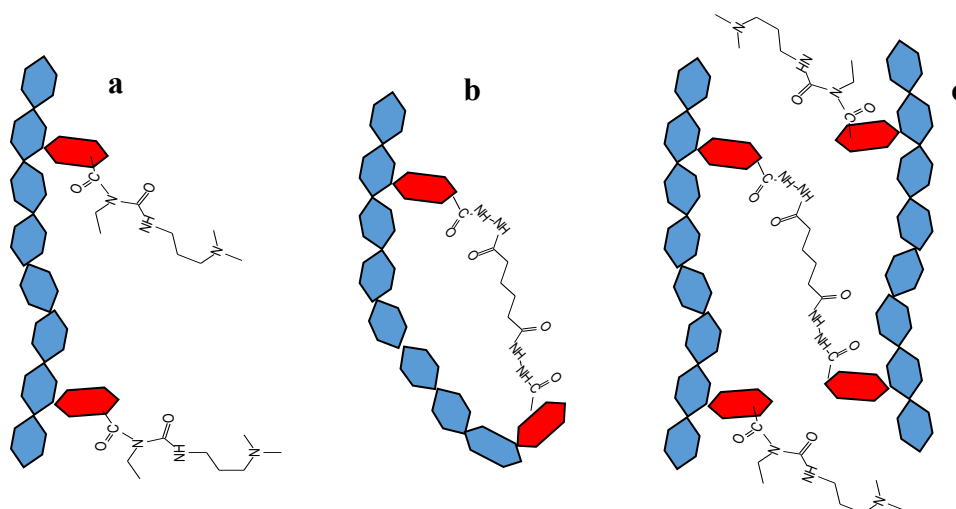


FIGURA 15 - PRODUTOS RESULTANTES DA REAÇÃO DE ADH COM XILANA NA PRESENÇA DE EDC.

4.3.2 Modificação B: Modificação de xilanas por reação com ADH na presença de formaldeído, em DMSO.

O formaldeído é um composto orgânico com características nucleofílicas. Pela análise da Figura 16 verificamos que o formaldeído tem a função de agente de ativação e reage com os grupo hidroxilo das unidades monoméricas da xilana, as Xylp, dando origem a um intermediário com grupos metilol. Em meio ácido ($pH < 6$), os grupos metilol sofrem uma reação de protonação e eliminação nucleofílica de água dando origem a um carbocátion ($R-O-CH_2^+$) que na presença de um agente-ligante, que neste caso estudo é o ADH, reage atacando o azoto constituinte da hidrazida e estabelece assim novas ligações do tipo metilol-hidrazida, com perda de molécula de água. Trata-se assim e uma reação de condensação entre os grupos hidroxilo da xilana e a hidrazida do ADH. As ligações metilol-hidrazida podem ocorrer entre grupos da mesma cadeia de xilana ou entre cadeias de xilana diferentes. O estabelecimento destas ligações permite assim aumentar o peso molecular da molécula de xilana.

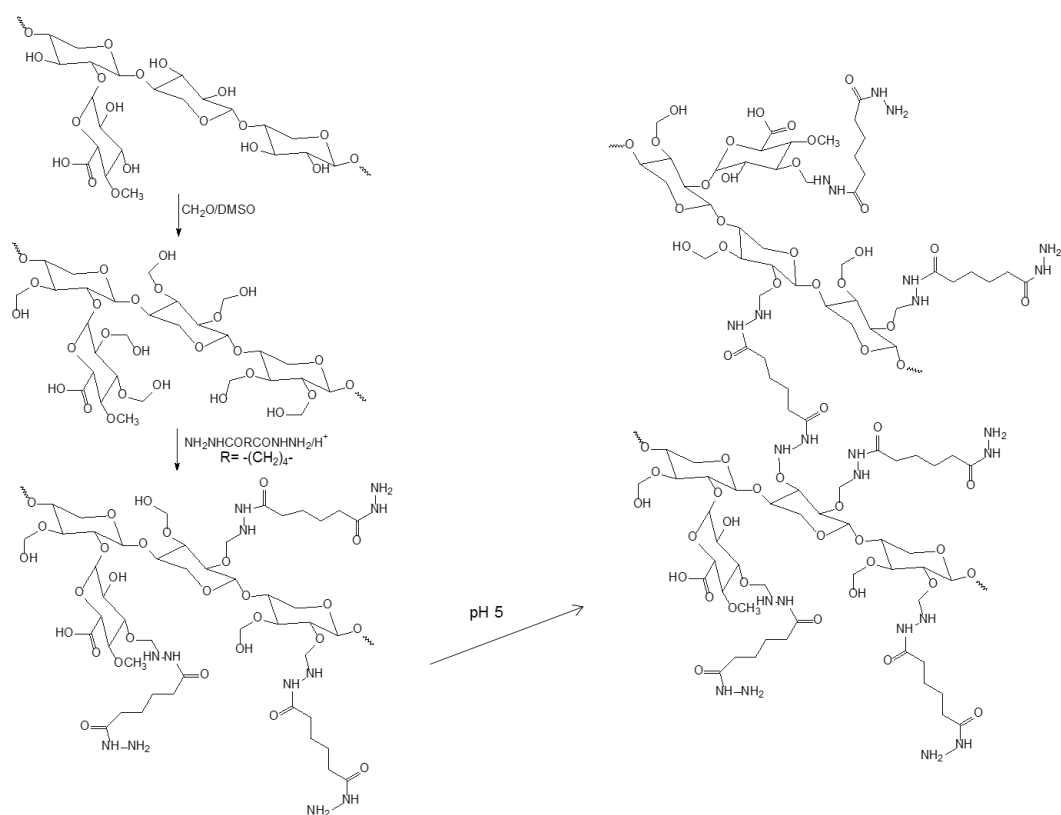


FIGURA 16 - MECANISMO DA REAÇÃO DE MODIFICAÇÃO DA XILANA COM ADH NA PRESENÇA DE FORMALDEÍDO, EM DMSO.

4.3.3 Modificação C: Modificação de xilanas por reação com diaminoureia na presença de formaldeído, em DMSO.

A modificação das xilanas por reação com diaminoureia na presença de formaldeído, em DMSO, tem um mecanismo de reação semelhante ao da modificação anteriormente referida. Neste caso é utilizada a diaminoureia como agente – ligante da reação em vez do ADH. O formaldeído tem a função de agente de ativação que reage com os grupos hidroxilos das Xylp dando origem a grupos metilol ($R - OCH_2OH$). O aduto resultante dessas modificações, em meio ácido sofre uma reação de condensação e origina um carbocatião ($R - OCH_2^+$). Este carbocatião sofre um ataque nucleófilo, na presença de diaminoureia, formando ligações amídicas. As ligações que se formam podem ser entre grupos da própria cadeia ou grupos de uma cadeia vizinha. A Figura 17 ilustra o esquema reacional da modificação.

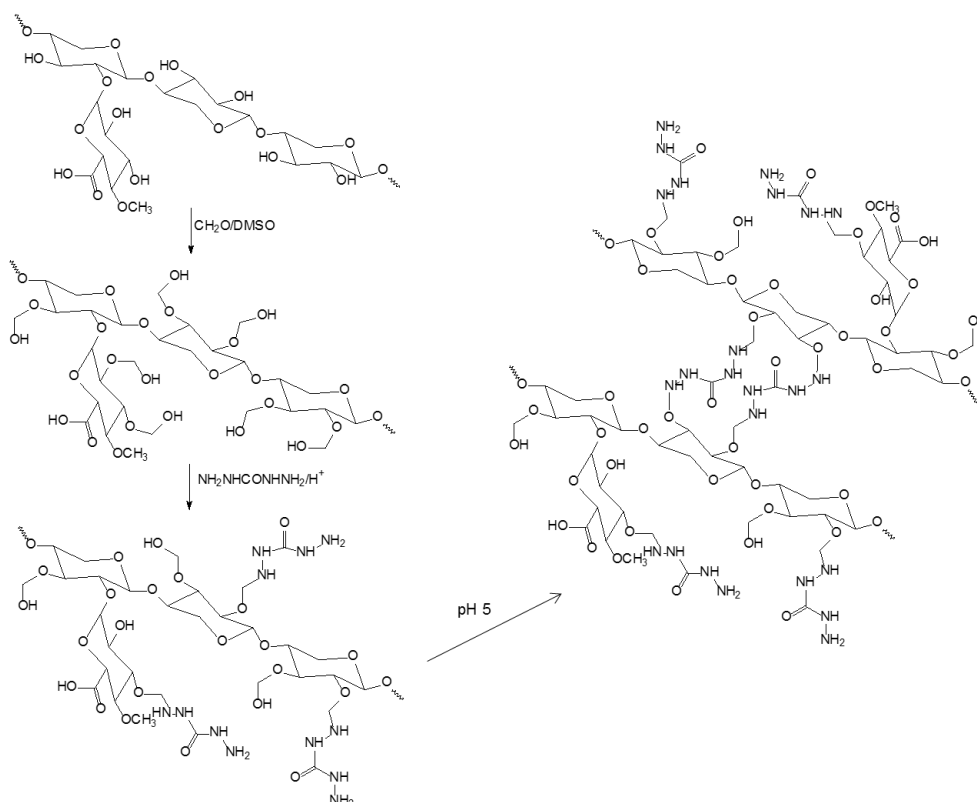


FIGURA 17 -MECANISMO DE MODIFICAÇÃO DE XILANAS POR REAÇÃO COM DIAMINOUREIA NA PRESENÇA DE FORMALDEÍDO, EM DMSO.

4.4 Caracterização das xilanas modificadas.

Realizadas as modificações procedeu-se assim à análise química das xilanas modificadas. A partir destas análises podemos verificar o sucesso das reações de modificação e as melhores condições e determinar a existência de novas ligações e quais foram as ligações formadas.

4.4.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica não destrutiva que fornece informação primária acerca da estrutura das amostras que estão a ser analisadas. Esta técnica quando aplicada às xilanas permite identificar os diferentes grupos funcionais da xilana, assim como também permite a estimativa de outras estruturas existentes na molécula de xilana, resultantes das reações de modificação.

Na Figura 18 encontra-se representado o espectro FTIR obtido para a amostra de xilana isolada a partir da Extração 1 (xyl_1) e as amostras de xilanas modificadas no sistema EDC/ADH em água a diferentes pH's, sendo a $xyl\ 1.1A$ a xilana sintetizada a pH 7 e a $xyl\ 1.2A$ a sintetizada a pH 5, e xilana modificada no sistema formaldeído/ADH em DMSO a $pH = 5$ ($xyl\ 1B$). A amostra de xyl_1 corresponde à amostra de xilana isolada a partir da Extração 1 que não sofreu qualquer tratamento para reduzir o teor de sais existente na sua composição.

Na Figura 19 encontra-se representado o espectro FTIR obtido para a amostra de xilana isolada a partir da Extração 3 (xyl_3) e as amostras de xilanas modificadas. Encontram-se representados os espectros FTIR das xilanas modificadas em sistema EDC/ADH em água a diferentes proporções de reagentes a pH 5 sendo que a $xyl\ 3.1A$ foi sintetizada com uma proporção de $COOH:EDC:ADH$ iguais a 1:5:4 e a $xyl\ 3.2A$ foi sintetizada com uma proporção de $COOH:EDC:ADH$ iguais a 1:2,5:2. Também se encontram representados os espectros de infravermelho das xilanas modificada em sistema formaldeído/ADH em DMSO a $pH = 5$ ($xyl\ 3B$) e das xilanas modificadas em sistema formaldeído/diaminoureia em DMSO a $pH = 5$ ($xyl\ 3C$) A amostra de xyl_3 corresponde

à amostra de xilana isolada a partir da Extração 3 que sofreu um tratamento de diálise durante três dias de forma a remover todos os sais existentes na sua composição.

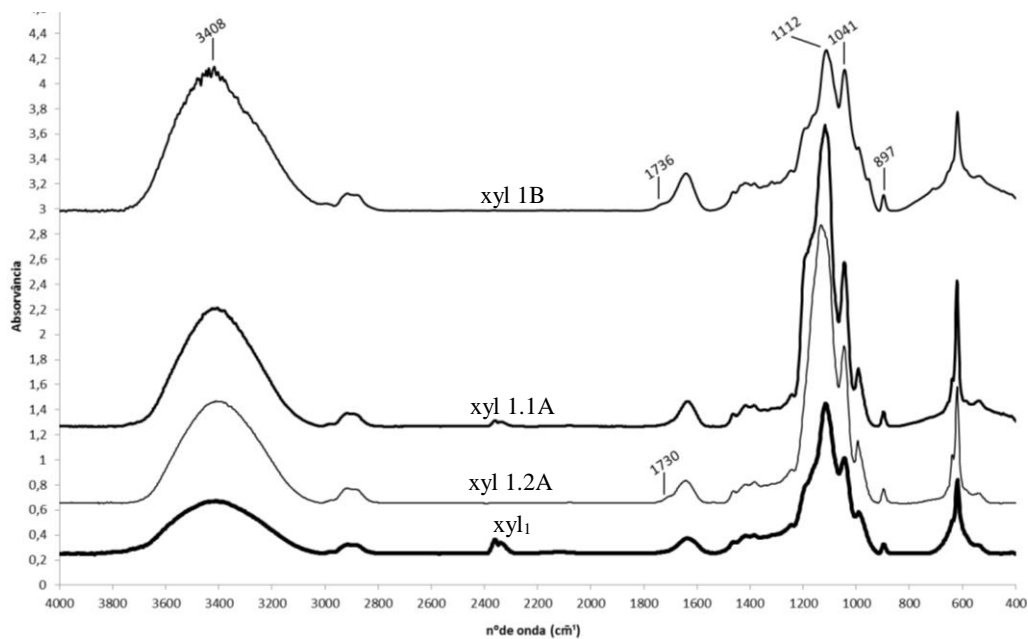


FIGURA 18 - ESPECTROS FTIR DAS AMOSTRAS XYL1, XYL 1.1A, XYL 1.2A E XYL 1B.

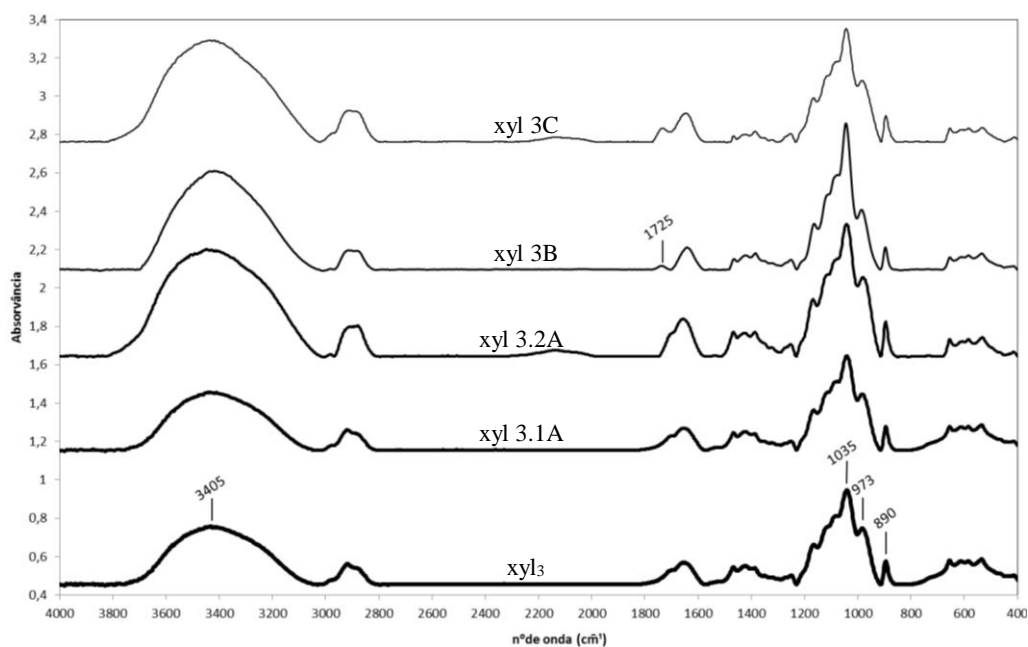


FIGURA 19 - ESPECTROS FTIR DAS AMOSTRAS XYL3, XYL 3.1A, XYL 3.2A, XYL 3B E XYL 3C.

Toda a discussão dos espectros de infravermelho seguiram o método de análise apresentado por Buslov *et al* (2009).

Pela observação das Figura 18 e 19 podemos verificar em todos os espectros uma banda de absorção aos $897 - 890\text{ cm}^{-1}$ indicativa da β -configuração da ligação ($1 \rightarrow 4$) glicosídica entre unidade de xilopiranosose da cadeia principal da xilana. Bandas características das vibrações dos hidróxidos livres não se observam o que indica que todos os grupos OH das xilanas estão envolvidos em ligações de hidrogénio.

As bandas de absorção mais intensas dos espetros de infravermelho das xilanas em análise encontram-se na região dos $3700 - 3000\text{ cm}^{-1}$ e na região dos $1200 - 1000\text{ cm}^{-1}$. Estes grupos de bandas correspondem às vibrações CO-H e C-OH, respetivamente. A banda com maior frequência, com um máximo aos $3415 - 3408\text{ cm}^{-1}$, corresponde às vibrações de alongamento do CO-H. A banda de absorção com máximo aos $1041 - 1035\text{ cm}^{-1}$ corresponde às vibrações de alongamento do C-OH. A posição das bandas e a sua semi-largura nos espectros de infravermelho das xilanas na região dos $3700 - 3000\text{ cm}^{-1}$ indicam que estas bandas resultam das vibrações dos grupos OH envolvidos nas ligações de hidrogénio inter- e intramoleculares e as vibrações dos grupos CH e CH₂.

Através da análise dos espectros de infravermelho das amostras xyl_1 e xyl_3 podemos verificar que em toda a região dos espectros as bandas são similares. Este facto indica que as xilanas examinadas têm sistemas de ligações de hidrogénio idênticos o que só comprova que a estrutura destas duas amostras é muito similar.

Relativamente aos espectros de infravermelho das xilanas modificadas da Figura 18, algumas diferenças são observadas. O espectro de infravermelho da $xyl\ 1.2A$, comparativamente com o espectro da $xyl\ 1.1A$, apresenta uma banda de absorvância proeminente na zona dos $1670 - 1650\text{ cm}^{-1}$ correspondente à 2ª banda aminica -NH-, e um ombro na zona dos $1736 - 1730\text{ cm}^{-1}$, correspondente às vibrações de alongamento da C = O em esteris. A junção destas duas bandas corresponde ao segmento da molécula O=C-NH- que no caso da amostra $xyl\ 1.1A$ não se verifica. A inexistência dessa banda leva a concluir que as condições em que a reação foi conduzida não foram as mais favoráveis e a modificação não ocorreu. Foi através desta análise inicial que as restantes reações foram realizadas a pH<6. Também na zona dos $3700 - 3000\text{ cm}^{-1}$,

estão incluídas as vibrações dos correspondentes à 1ª banda aminica —NH— , no caso das xilanas modificadas.

Relativamente aos espectros de infravermelho das xilanas modificadas da Figura 19 as conclusões retiradas foram as mesmas referidas anteriormente para a Figura 18. Podemos observar que o valor das bandas são menores. Este facto pode ser explicado por na Figura 18 estarem representados espectros de xilanas com um teor de sais na sua constituição elevado. No caso dos espectros de infravermelho representados na Figura 19, todas as amostras têm como base a xyl₃, que sofreu um processo de diálise antes de ser submetida às reações de modificação. Podemos observar nos espectros de infravermelho das amostras xyl 3B e xyl 3C que há uma intensidade maior das bandas correspondentes ao segmento da molécula O=C—NH— .

4.4.2 Peso molecular das xilanas modificadas.

O método de preparação das amostras foi o mesmo utilizado para a determinação do peso molecular das xilanas isolada. As xilanas modificadas foram submetidas a cromatografia por permeação em gel (GPC). Através desta análise não foi possível determinar o peso molecular média de cada um das xilanas modificadas. Observou-se a formação de um gel ao adicionar o DMA8 às amostras de xilana, confirmando assim que as reações de modificação ocorreram. No entanto, o sistema utilizado não foi o ideal para esta técnica de caracterização. Na Figura 20 encontram-se representadas as curvas gaussianas correspondentes ao peso molecular das amostras de xilanas xyl₃ e xyl 3.2 A.

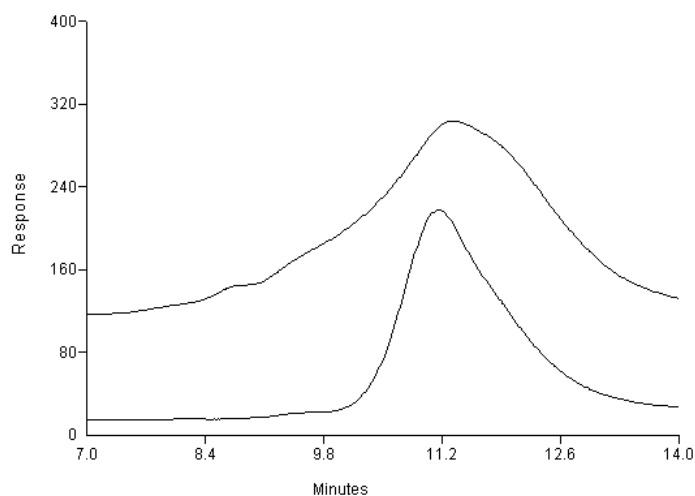


FIGURA 20 - CROMATOGRAMAS CORRESPONDENTES ÀS AMOSTRAS DE XYL₃ (BAIXO) E XYL 3.2 A (CIMA).

Pela análise da Figura 20 podemos observar que a xyl 3.2A tem um peso molecular de 49,6 *kDa* que é mais que o dobro do peso molecular da xilana não isolada, que apresenta um peso molecular de 22,9 *kDa*. Assim sendo o objetivo de aumentar o peso molecular da xilana foi bem sucedido.

Três sugestões são apontadas para justificar o insucesso da técnica de caracterização por permeação em gel:

- Tendo em conta o uso de agente de ativação e agente - ligante em excesso, o produto final resultante apresenta um comportamento semelhante ao de um polímero reticulado e portanto não dissolve no solvente;
- Em alguns cromatogramas foi possível observar uma curva unimodal Gaussiana mais deslocada para a direita comparativamente ao cromatograma da xilana inicial. Este facto permite concluir que no caso da Modificação A, por exemplo, a reação de formação de aduto foi favorecida, nas condições em que a modificação se deu, ou a reação de modificação não ocorreu e o que se observa é a curva correspondente à massa molecular das cadeias de xilana que não reagiram.
- Para o caso das Modificações B e C verificou-se que o sistema utilizado para a dissolução das amostras as degradava, impedindo assim a realização da caracterização. Essa degradação era visível quando após a preparação da amostra para a realização da caracterização ocorria uma mudança da tonalidade da mesma.

É necessário ter em atenção que na técnica de cromatografia por permeação em gel o princípio base é a determinação dos pesos moleculares de um determinado composto tendo como referência moléculas padronizadas e com estruturas semelhantes para que no tratamento dos dados possa haver uma comparação. No caso em estudo os padrões utilizados foram pululanas, que são polímeros com pesos moleculares variados que apresentam uma cadeia linear. As xilanas modificadas não apresentam de todo uma cadeia linear, tendo em conta a aleatoriedade da reação, e portanto, apresentam um volume hidrodinâmico muito maior que as pululanas. O facto de terem um volume hidrodinâmico tão grande faz com que as moléculas de xilana modificadas fiquem mais tempo retidas nas colunas do cromatógrafo e o seu tempo de passagem seja superior e consequentemente ocorre um deslocamento das curvas de massa molecular para a direita.

Tendo em conta o aspeto referido anteriormente, os pesos moleculares determinados podem não ser os pesos moleculares reais.

4.4.3 Ressonância Magnética Nuclear de próton (^1H RMN).

As xilanas isoladas e modificadas foram sujeitas a espectroscopia por ^1H RMN. A Figura 20 representa o espectro de ^1H RMN correspondente à Xyl_3 dialisada (espectro de cima) e o espectro ^1H RMN correspondente à Xyl 3.2A (espectro de baixo).

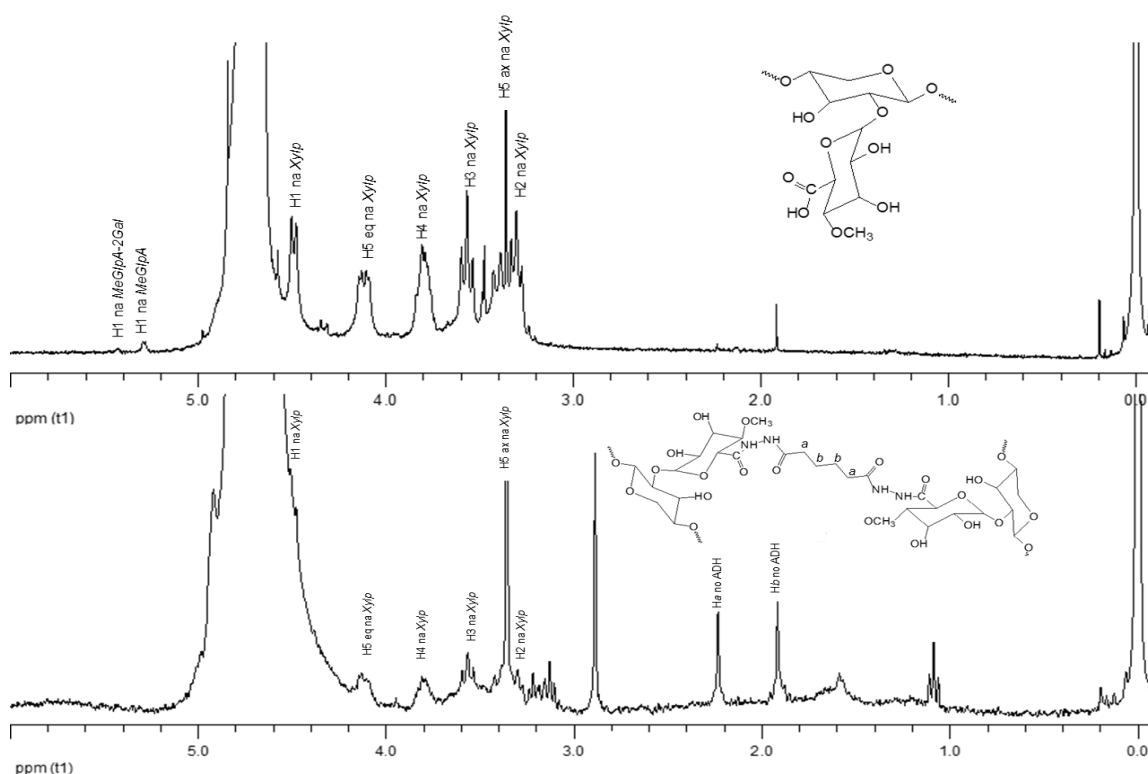


FIGURA 21 - ESPECTRO DE ^1H RMN A 1D DAS AMOSTRAS xyl_3 E DA xyl 3.2A EM D_2O .

Através da análise detalhada dos espectros de ressonância magnética de próton representados na Figura 20 é possível a confirmação do surgimento de novas ligações resultantes das reações de modificação e consequentemente a implementação de novas cadeias na estrutura das xilanas.

No espectro correspondente à xilana isolada as ressonâncias foram analisadas de acordo com dados da literatura (Evtyugin, Tomas, & Silva, 2003), tal como foi realizado anteriormente no estudo da caracterização das xilanas (4.2.4). A quantificação dos diferentes fragmentos estruturais de $\beta - \text{D} - \text{Xylp}$ e respetivas ramificações foi realizada de acordo com a metodologia utilizada por Teleman *et al* (2000).

A análise do espectro de ^1H RNM (Figura 20) de ambas as amostras revelou um grupo de sinais de prótons proeminentes a 4.49, 4.13, 3.81, 3.57, 3.56 e 3.30 ppm atribuídos aos prótons H-1, H-5_{eq}, H-4, H-3, H-5_{ax} e H-2, respetivamente, de resíduos não substituídos de β – D – xilopiranosose ligadas internamente por ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$.

No espectro correspondente à xilana dialisada observam-se dois picos menos intensos na região entre 5.28 e 5.42 ppm. O primeiro corresponde ao H-1 do ácido 4 – O – metil-D-glucurónico (4OMeGlcA), sugerindo que as unidades glucuranosilo são essencialmente metiladas. A ressonância a 5.42 ppm corresponde ao H-1 de ácido 4OMeGlcA substituídos no O – 2 com unidades galatopiranosose (Galp) ou glucopiranosose (GlcP) (Evyugin, Tomas, & Silva, 2003).

No espectro correspondente à xilana modificada em sistema EDC/ADH em água observam-se dois picos intensos na região dos 1.90 e 2.25 ppm. Ambos os picos correspondem aos hidrogénios dos grupos CH_2 da molécula de ADH (Dutta, et al., 2012). O primeiro corresponde aos hidrogénios dos grupos metilo na extremidade da cadeia carbonada do ADH e o segundo pico corresponde aos hidrogénios dos grupos metilo no interior da cadeia carbonada do ADH.

Seria de esperar encontrar mais picos na região dos 10 ppm. A inexistência desses picos deve-se ao facto de ter ocorrido uma substituição dos hidrogénios por deutérios ($\text{NH} \rightarrow \text{ND}$).

Tendo em conta que na reação de modificação realizada a proporção dos grupos $\text{COOH}:\text{EDC}:\text{ADH}$ foram iguais a 1:2,5:2 para a amostra em questão (xyl 3.2A) determinou-se a proporção teórica e real através de uma análise mais detalhada do espectro correspondente, recorrendo ao método de integração dos picos na região dos 2.25 ppm. Teoricamente seria de esperar uma proporção de $\text{MeGlcA}:\text{ADH}$ igual a 1:1 tendo em conta que para grupo urónico reage um grupo hidrazida. Verificou-se que a proporção real é de $\text{MeGlcA}:\text{ADH} = 1:4,6$, ou seja, quase o quádruplo do resultado teórico relativamente à proporção de ADH. Este resultado pode ser explicado pela facto de parte da xilana não ter dissolvido em água deuterada e a xilana que dissolveu ter um maior número de grupos urónicos do que o estimado médio.

4.4.4 Ressonância Magnética Nuclear com Carbono-13 (^{13}C RMN).

De forma a obter um estudo mais aprofundado da estrutura da xilanas modificada foram realizados espectros de ^{13}C RMN. Para poder haver um termo de comparação foram realizados espectros às amostras de xilana dialisada (xyl_3) e xilana modificada (xyl 3.2 A) que se encontram representados na Figura 21 sendo o espectro de cima o correspondente à xilana dialisada e o espectro subjacente o espectro correspondente à xilana modificada.

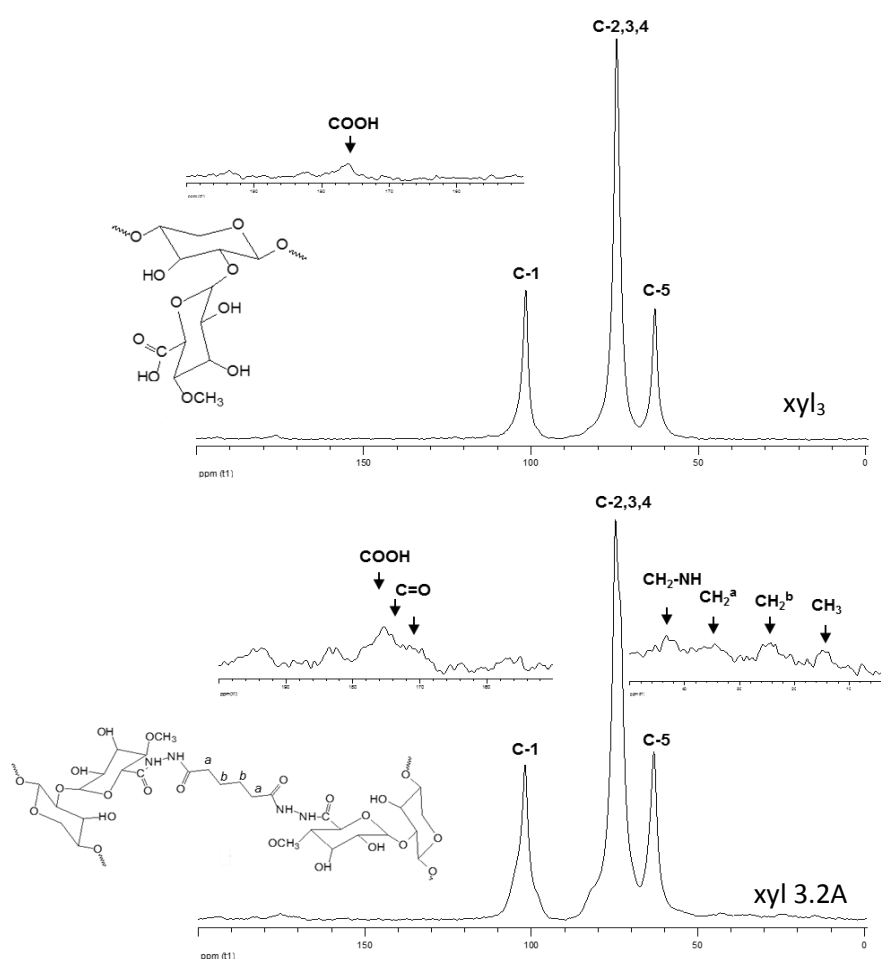


FIGURA 22 - ESPECTROS DE ^{13}C RMN A 1D DAS AMOSTRAS DE xyl_3 E xyl 3.2 A.

As ressonâncias de cada amostra de xilana isolada foram analisadas de acordo com dados da literatura (Evtuyugin, Tomas, & Silva, 2003).

A análise do espectro de ^{13}C RNM da xilana dialisada (Figura 21, em cima) revelou um grupo de sinais de carbono proeminentes a 102.5, 74.8 e 63.9 ppm atribuídos aos carbonos C-1, C-2,3,4 e C-5, respetivamente, correspondentes a resíduos não substituídos de β - D - xilopiranosose ligadas internamente por ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$. Na

análise mais detalhada ao espectro, na região 170 – 180 ppm, observa-se um pico menos intenso na zona dos 176 ppm que corresponde ao carbono do ácido 4 – *O* –metil-D-glucurónico (4OMeGlc_pA), sugerindo que as unidades glucuranosil são essencialmente metiladas (Evtugyin, Tomas, & Silva, 2003; Miyake, Tomita, Hse, & Myers, 1989).

A análise do espectro de ¹³C RNM da xilana modificada (Figura 21, em baixo) também revelou um grupo de sinais de carbono proeminentes a 102.5, 74.8 e 63.9 ppm atribuídos aos carbonos C-1, C-2,3,4 e C-5, respetivamente, correspondentes a resíduos não substituídos de β – *D* – xilopirranose ligadas internamente por ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ (Evtugyin, Tomas, & Silva, 2003). Na análise mais detalhada ao espectro, na região 170 – 180 ppm, observa-se três pico menos intenso na zona dos 176, 174 e 171 ppm que corresponde ao carbono do ácido 4 – *O* –metil-D-glucurónico (4OMeGlc_pA) e ao carbono do grupo C=O do ADH que reagiu com o grupo glucurónico formando uma ligação amídica (ligação metilol-hidrazida), respetivamente. Também se pode observar que, na região dos 10 – 50 ppm, se verifica a existência de quatro picos menos intensos na zona dos 12, 24, 34 e 44 ppm correspondentes aos carbonos dos grupos CH₃, CH₂^b, CH₂^a e CH=NH do ADH, confirmando assim o sucesso da reação de modificação com o sistema EDC/ADH em água (Miyake, Tomita, Hse, & Myers, 1989).

Preliminarmente realizou-se em ambos os espectros de carbono uma integração na zona entre 168-178 ppm assinalados nos grupos COOH e CO. Este integral no espectro das xilanas correspondente aos sinais dos grupos COOH. No espectro relativo à xilana não modificada verificou-se que o valor obtido foi 0,02 grupos urónicos para cada unidade de xilopirranose (baseado no sinal correspondente ao C1 a 102 ppm), o que nos leva a concluir que é uma proporção muito inferior à estimada por ¹H RMN. Este resultado leva a concluir que a insolubilidade da xilana em água apenas permitiu a análise parcial da mesma e que existem cadeias de xilana com uma maior abundância de grupos urónicos do que outras. No espectro relativo à xilana modificada verificou-se que o valor obtido foi 0,05 grupos urónicos para cada unidade de xilopirranose (baseado no sinal correspondente ao C1 a 102 ppm). Neste caso é necessário ter em conta que a região integrada inclui grupos carboxílicos que não reagiram e grupos carbonilos provenientes do ADH. Teoricamente seria de esperar que o valor obtido fosse 0,04 grupos urónicos para cada unidade de Xyl_p. Este valor pode ser explicado por uma reação de condensação

incompleta em que não ocorre a formação da ligação amídica nas duas extremidades da cadeia do ADH mas só numa das extremidades, dando origem a uma ramificação e não a uma ponte entre cadeias de xilana. Uma análise ao resultado obtido permite concluir que futuramente uma quantidade menor de reagente pode ser utilizada na realização da reação de modificação e/ou que a solubilidade da xilana deve ser aumentada de forma a dissolver por completo.

Na Figura 23 encontram-se representados os espectros correspondentes às xilanas modificadas xyl 3B e xyl 3C.

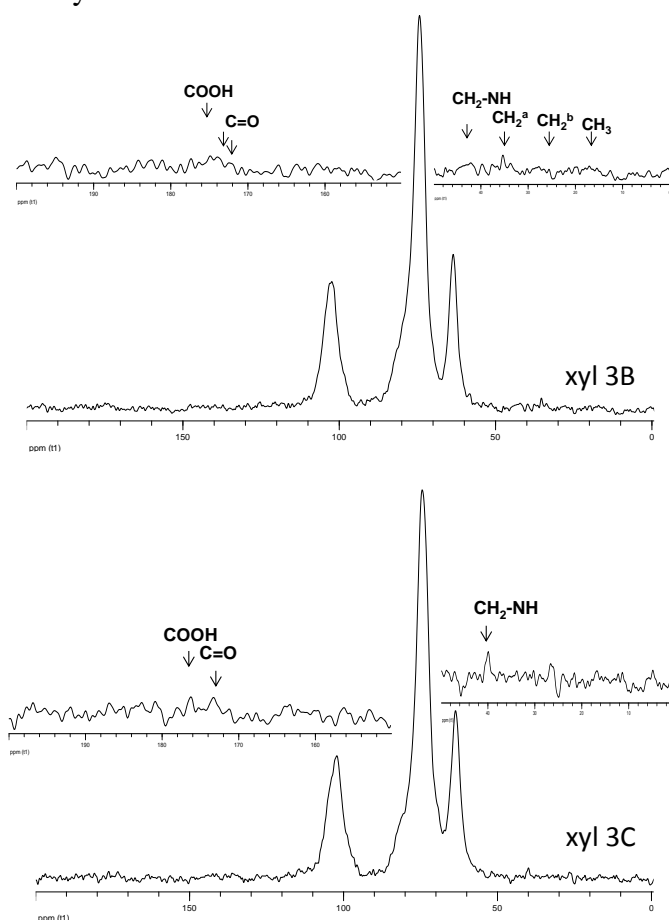


FIGURA 23 - ESPECTROS DE ^{13}C RMN A 1D DAS AMOSTRAS DE XYL 3B E XYL 3C.

Da análise das ressonâncias de ^{13}C RMN das xilanas modificadas representadas na Figura 23 podemos observar sinais de carbono com intensidade muito baixa o que não permite obter resultados muito conclusivos. A baixa intensidade dos sinais de carbono pode ser explicada pela ocorrência das reações de modificação ser muito limitada. Essa limitação surge quando o produto resultante do ataque nucleófilo aos carbocátions, na

presença de ADH ou diaminoureia, não se forma em quantidade suficiente ou na fase de precipitação este produto sofre degradação com a acetona.

4.4.5 Análise Termogravimétrica (TGA).

Duas amostras de xilanas (*xyl 3* e *xyl 3.1A*) foram sujeitas a um aumento gradual de temperatura (25 – 600°C), em atmosfera de oxigénio, e foi medida a massa dessas amostras ao longo do tempo. A Figura 22 apresenta a análise termogravimétrica das amostras de xilanas.

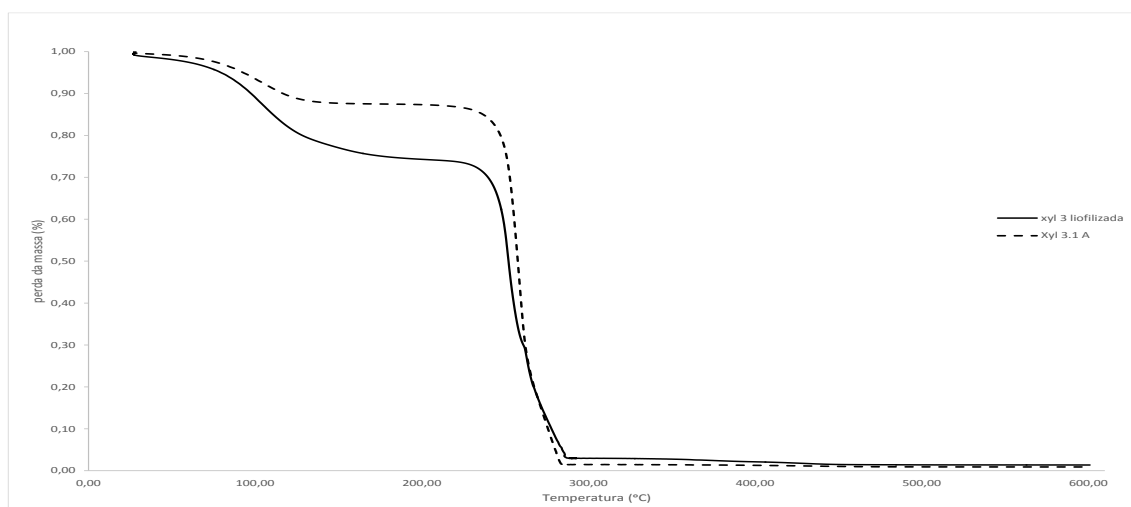


FIGURA 24 - CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICA DAS AMOSTRAS XYL₃ E XYL 3.1A

Pela observação dos termogramas podemos verificar que a amostra não apresenta teor de cinzas após realização da diálise, como seria de esperar. Observa-se que os termogramas das amostras *xyl 3* e *xyl 3.1A* apresentam três estágios. O primeiro estágio ocorre perto dos 100°C, correspondente à evaporação de água residual absorvida e compostos voláteis presentes nas amostras. O segundo estágio ocorreu perto dos 230 – 250°C, estando relacionado com a rotura das cadeias de xilana. Relativamente ao terceiro estágio das amostras *xyl 3* e *xyl 3.1A*, observado perto dos 300 – 400°C, está relacionado com a carbonização dos produtos em cinzas. Podemos também observar que a temperatura de degradação da amostra *xyl 3.1A* (260°C) é inferior à temperatura de degradação da amostra *xyl₃* (265°C), que se deve ao facto de os grupos hidrazida serem relativamente mais instáveis termicamente.

5 Conclusões

O objetivo deste trabalho consistiu no estudo da possibilidade de extração e isolamento de xilanas de pasta branca kraft de eucalipto e elucidar a possibilidade de aumento do peso molecular das mesmas para posterior utilização na indústria papeleira.

Através da realização deste trabalho foi possível retirar algumas conclusões acerca do isolamento e modificação de xilanas:

1. A xilana da pasta branca kraft de *E. globulus* foi extraída com soluções aquosas de NaOH a 10% durante 1 hora e o seu isolamento foi feito sob a forma de precipitado utilizando soluções aquosas de HCl. Observou-se um teor de sais nas amostras muito elevado (55 – 81%), o que dificultou as reações de modificação e por esse motivo foi necessário realizar a purificação da xilana por diálise de uma das amostras. A análise estrutural mostrou que as xilanas isoladas são 2 – *O* –metil- α – *D* – glucurono – *D* – xilanas com pesos moleculares compreendidos no intervalo dos 26,3 – 28,2 kDa.
2. A modificação das xilanas foi realizada recorrendo ao método de bioconjugação em soluções aquosas num sistema constituído por ADH na presença de EDC ou através de derivados de metilol em dimetilsulfóxido. A reação de bioconjugação consiste na reação do EDC com os grupos urónicos dos ácidos carboxílicos da xilana formando um intermediário que juntamente com o ADH na função de agente-ligante estabelece pontes intermoleculares entre xilanas. As reações de modificação através de derivados de metilol em dimetilsulfóxido consistem na utilização de um agente de ativação, o formaldeído, que reage com os grupos hidroxilo das Xylp, dando origem a um intermediário com grupos metilol que na presença de ADH como agente-ligante estabelece ligações entre cadeias de xilana. Os produtos derivatizados foram caracterizados por teor de cinzas, estrutura e peso molecular. Através das técnicas de FTIR e ¹H RMN concluiu-se que todas as reações de modificação ocorreram comprovado pelo aparecimento de sinais correspondentes a novas

ligações. Por ^{13}C RMN em estado sólido verificou-se que a reação de bioconjugação ocorreu com uma extensão razoável. O sucesso da reação foi confirmado pelo surgimento de sinais correspondentes aos carbonos envolvidos na ligação metilol-hidrazida. As reações de modificação com derivados de metilol apresentaram resultados pouco conclusivos. Verificou-se que a amostra dialisada apresentava um teor de cinzas muito mais baixo e que a utilização dessa amostra nas reações de modificação por bioconjugação levou ao sucesso das mesmas sendo confirmado pelo peso molecular da amostra xyl 3.1A correspondente a 49,6 kDa.

Em suma, a reação de bioconjugação apresenta resultados positivos quando realizadas a pH's compreendidos entre 4 – 5, no entanto a quantidade de grupos carboxílicos na constituição das xilanas é fundamental para o sucesso. É uma reação com potencial futuro na aplicação industrial. Estudos mais aprofundados devem ser realizados no sentido de otimizar as condições em que as reações de modificação das xilanas são mais favoráveis, de modo a que a sua aplicação futura na indústria se torne um processo viável.

6 Referências

- (18 de Março de 2014). Obtido de grupo Portucel Suporcel:
<http://www.portucelsoporcel.com/>
- Alekhina, M., Mikkonen, K., Alen, R., Tenkanen, M., & Sixta, H. (2014). Carboxymethylation of alcali extrated xylan for preparation of bio-based packaging films. *Carbohydrate Polymers*, 100, 89 - 96.
- Buslov, D., Kaputski, F., Sushko, N., Torgashev, V., Solov'eva, L., Tsarenko, V., . . . Larchenko, L. (2009). Infrared spectroscopy analysis of the structure of xylans. *Journal of Applied Spectroscopy*, 76, 801-805.
- Cheng, K., Winter, W., & Stipanovic, A. (2012). A modulated-TGA approach to the kinetics of lignocellulosic biomass pyrolysis/combustion. *Polymer Degradation and Stability*, 97, 1606 - 1615.
- Dutta, A., Pramanik, M., Patra, A., Nandi, M., Uyama, H., & Bhaumik, A. (2012). Hybrid porous Tin(IV) Phosphonate: an efficient catalyst for adipic acid synthesis and a very good absorbent for CO₂ uptake. *Chem. Commun.*, 48, 6738-6740.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinze. (2005). Hemicelluloses. *Advances in Polymer Science*, 186, 1-67.
- Ek, M., Gellerstedt, G., & Henriksson, G. (2009). *Pulp and Paper Chemistry and Technology – Wood Chemistry and Wood Biotechnology, Volume 1*. Berlin: Walter de Gruyter & Company.
- Evtuguin, D., & Neto, C. (2007). Recent advances in Eucalyptus Wood Chemistry: structural features through the prism of technological response. *Proceedings of 3rd International Colloquium of Eucalypt Pulp (ICEP)*, Sec 2: 1-12.
- Evtugun, D. (2013). in Apontamentos de TMAF.
- Evtugun, D. V., Tomas, J. L., & Silva, A. M. (2003). Characterization of an acetylated heteroxylan from Eucalyptus globulus Labill. *Carbohydrate Research*, 338, 597-604.
- Fengel, D., & Wegener, G. (1984). *Wood: Chemistry, Ultrastucture, Reactions*. Berlin: De Gruyter.
- Fundador, N., Enomoto-Rogersa, Y., Takemura, A., & Iwata, T. (2012). Acetylation and characterization of xylan from hardwood kraft pulp. *Carbohydrate Polymers*, 87, 170-176.
- Hart, P., & Rudie, A. (2012). *The Bleaching of Pulp* (5th ed.). USA: TAPPI press.
- Hon, D. N.-S. (2007). *Wood and cellulosic chemistry* (2nd ed.). New York: Marcel Dekker.
- Instruments, M. (13 de 03 de 2013). *Malvern Instruments*. Obtido de Malvern Instruments:
<http://www.malvern.com/br/products/technology/gel-permeation-chromatography/>
- Lisboa, S., Evtugun, D., Pascoal Neto, C., & Goodfellow, B. (2005). Isolation and strutural characterization of polysaccharides dissolved in Eucalyptus globulus kraft black liquors. *Carbohydrate Polymers*, 60, 77-85.

- Liu, L., Liu, D., Wang, M., Du, G., & Chen, J. (2007). Preparation and characterization of sponge-like composites by cross-linking hyaluronic acid and carboxymethylcellulose sodium with adipic dihydrazide. *European Polymer Journal*, 43, 2672–2681.
- Lopéz-Alonso, J., Díez-García, F., Font, J., Ribó, M., Vilanova, M., Scholtz, J., . . . Laurents, D. (2009). Carbodiimide EDC induces crosslinking that stabilize RNase A C-dimer against dissociation: EDC adducts can affect protein net charge, conformation and activity. *Bioconjugate Chemistry*, 20, 1459-1473.
- Maddison, S., & Carnalli, J. (2013). pH optimization of amidation via carbodiimides. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52, 13547-13555.
- Miyake, K., Tomita, B., Hse, C., & Myers, G. (1989). New curing system of urea-formaldehyde resins with polyhydrazides III. *Mokuzai Gakkaishi*, 35, 742-747.
- Nakajima, N., & Ikada, Y. (1995). Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chemistry*, 6, 123-130.
- Neto, C., Evtugin, D., Pinto, P., Silvestre, A., & Freire, C. (s.d.). *Química da madeira de eucalyptus globulus: especificidades e impacto nos processos de cozimento e branqueamento*. CICECO.
- Neto, P., & Evtugin, D. (2004). Componentes macromoleculares da madeira. Em J. Seixas de Melo, M. Moreno, H. Burrows, & M. Gil, *Química de polímeros* (pp. 545-569). Coimbra: Imprensa da universidade.
- PerkinElmer. (Março de 2014). *Thermogravimetric Analysis (TGA): A Beginner's Guide*. Obtido de perkinelmer.com: http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74556GDE_TGABeginnersGuide.pdf
- Petzold-Welcke, K., Schwikal, K., Daus, S., & Heinze, T. (2014). Xylan derivatives and their application potential – Mini-review of own results. *Carbohydrate Polymers*, 100, 80–88.
- Pinto, P. C., Evtugin, D. V., & Neto, C. (2005). Structure of hardwood glucuronoxylans: modifications and impact on pulp retention during wood kraft pulping. *Carbohydrate Polymers*, 60, 489-497.
- Rowell, R. M. (2005). *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. Boca Raton: CRC Press.
- Shiraishi, N., & Hon, D. (2001). *Wood and Cellulosic chemistry*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Sixta, H. (2006). *Handbook of Pulp, Volume 1*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Sjostrom, E. (1993). *wood chemistry - fundamentals and applications*. USA: Academic Press.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis* (6th Edition ed.). USA: Thomson Brooks/Cole.
- Tejano, A., Antal, M., & Van de Ven, T. (2011). Effect of EDC/ADH fibre crosslinking on the wet-web strength of bhp with and without PCC loading. *Journal of Science & Technology for Forest Products and Process*, 1, 27 - 31.

- Teleman, A., Lundqvist, J., Tjerneld, F., Stalbrnad, H., & Dahlman, O. (2000). Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing ¹H RMN and ¹³C RMN spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 329, 807–815.
- Tomihata, K., & Ikada, Y. (1997). Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *Journal of Biomedical Mater Research*, 37, 243-251.
- U.S. Congress, O. o. (1989). *Technologies for Reducing Dioxin in the Manufacture of Bleached Wood Pulp*. Washington, DC: U.S. Government Printing Office.

Apêndice A – Dados experimentais.

Neste apêndice encontram-se tabelados detalhadamente todos os valores de dados experimentais obtidos ao longo do trabalho experimental.

TABELA 10 - CONDIÇÕES GERAIS DA EXTRAÇÃO ALCALINA.

Pasta seca, <i>g</i>	50
Consistência, %	5
Carga de <i>NaOH</i>, % (<i>g NaOH</i> / 100 <i>g sol.</i>)	10
Borohidreto de sódio, (100 <i>mg</i>/100 <i>g sol.</i>)	
Temperatura, °C	25
Tempo, min	60
Agitação	SIM

TABELA 11 - PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E REAGENTES DA EXTRAÇÃO ALCALINA.

Teor de secura da pasta, %	17,44
Quantidade de pasta t.q., <i>g</i>	286,7
Volume final, <i>mL</i>	1000,0
Água a adicionar, <i>mL</i>	713,3
<i>NaOH</i>, carga, <i>g</i>	100
Concentração <i>NaOH</i>, %	98
Quantidade de <i>NaOH</i> t.q., <i>g</i>	102,04
Borohidreto, carga, <i>mg</i>	100
Concentração <i>NaBH</i>₄, %	99,5
Quantidade de <i>NaBH</i>₄ t.q., <i>mg</i>	100,5
Homogeneização	SIM

TABELA 12 - pH INICIAL E FINAL DO FILTRADO DE CADA EXTRAÇÃO NA FASE DE NEUTRALIZAÇÃO.

Extração	pH_i±0,01	pH_f±0,01
1	12,81	7,06
2	12,30	7,06
3	12,30	6,53
4	12,63	7,15
5 (66°SR)	12,80	1,71

TABELA 13 - VALORES ESTATÍSTICOS ¹H RMN DAS UNIDADES ESTRUTURAIS DA XYL₁.

Unidade estrutural	Estatística
4OMeGlc _p A-2Gal	1
4OMeGlc _p A	2,36
(Xyl _p)	37,3

Isolamento e modificação de xilanas da pasta branca.

TABELA 14 - DADOS GC - FID.

	Ramnose	Fucose	Ribose	Arabinose	Xilose	Manose	Galactose	Glucose	m PI (mg)
TR (min)	9	9,22	10,35	10,97	12,97	22,38	24,24	26,1	
Factores de Resposta	1,1505	0,9695	1,0215	1,0066	1,0215	0,9465	0,7588	1,0733	2,006
(Y=mx+b)									

Amostra	mpeso_sec o (mg)	Ensai o	Área									maçúcar (mg)							
			PI	Ramnose	Fucose	Ribose	Arabinos e	Xilose	Manose	Galactos e	Glucos e	Ramn os e	Fucose	Ribose	Arabinos e	Xilose	Manos e	Galactos e	Glucos e
1	10,1	1_1	44672 1	0	0	0	3808	469103	0	2400	173859	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,01721	2,15180	0,0000 0	0,00818	0,8379 4
		1_2	29903 9	0	0	0	1965	331953	0	230806	3015	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,01327	2,27467	0,0000 0	1,17484	0,0217 1
2	10,4	2_1	11232 3	0	0	0	0	140716	0	0	674	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,00000	2,56711	0,0000 0	0,00000	0,0129 2
		2_2	35610 3	0	0	0	4370	414091	0	4810	6756	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,02478	2,38281	0,0000 0	0,02056	0,0408 5
3	10,2	3_1	49925 9	0	0	0	6610	273648	0	1883	7475	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,02673	1,12314	0,0000 0	0,00574	0,0322 4
		3_2	51604 7	0	0	0	5809	276507	0	1966	10944	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,02273	1,09796	0,0000 0	0,00580	0,0456 6
4	10,6	4_1	61450 1	0	0	0	8263	765467	3791	6206	29982	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,02715	2,55254	0,0117 1	0,01537	0,1050 5
		4_2	41801 9	0	0	0	6329	529096	0	5299	15823	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,03057	2,59363	0,0000 0	0,01930	0,0815 0
5	10,7	5_1	52420 2	0	0	0	7861	795537	0	7083	19501	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,03028	3,10979	0,0000 0	0,02057	0,0801 0
		5_2	50436 6	0	0	0	5010	764015	0	6944	21539	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,02006	3,10403	0,0000 0	0,02096	0,0919 5
6	10,0	6_1	23405 6	74780	0	0	2798	267389	0	2459	16950	0,73737	0,0000 0	0,0000 0	0,02414	2,34095	0,0000 0	0,01599	0,1559 2
		6_2	37829 3	56271	0	0	5323	435004	0	3511	7512	0,34330	0,0000 0	0,0000 0	0,02841	2,35632	0,0000 0	0,01413	0,0427 5
7	10,1	7_1	45616 6	0	0	0	5215	238728	0	0	4002	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,02308	1,07238	0,0000 0	0,00000	0,0188 9
		7_2	47048 9	0	0	0	4660	240145	0	2841	4722	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,02000	1,04591	0,0000 0	0,00919	0,0216 1
8	10,8	8_1	14234 0	0	0	0	2378	129036	0	1172	4915	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,03373	1,85760	0,0000 0	0,01253	0,0743 4
		8_2	20908 3	0	0	0	2647	191607	0	1121	6837	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,02556	1,87785	0,0000 0	0,00816	0,0704 0

Isolamento e modificação de xilanas da pasta branca.

% m/m								% de açúcar							
Ramnose	Fucose	Ribose	Arabinos e	Xilose	Manose	Galactos e	Glucos e	Ramnos e	Fucose	Ribose	Arabinos e	Xilose	Manos e	Galactos e	Glucos e
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,17042	21,3049 1	0,00000	0,08097	8,2964 3	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,14997	18,7483 2	0,0000 0	0,07287	7,4667 9
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,13137	22,5214 7	0,00000	11,63205	0,2149 3	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,11561	19,8188 9	0,0000 0	10,46884	0,1934 3
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,00000	24,6837 3	0,00000	0,00000	0,1279 2	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,00000	21,7216 8	0,0000 0	0,00000	0,1151 2
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,24534	22,9116 4	0,00000	0,20357	0,4044 3	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,21590	20,1622 4	0,0000 0	0,18321	0,3639 9
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,26210	11,0112 2	0,00000	0,05628	0,3160 4	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,23065	9,68988	0,0000 0	0,05066	0,2844 3
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,22284	10,7643 1	0,00000	0,05685	0,4476 5	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,19610	9,47259	0,0000 0	0,05117	0,4028 9
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,25615	24,0806 0	0,11050	0,14502	0,9910 2	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,22541	21,1909 3	0,0994 5	0,13052	0,8919 2
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,28842	24,4681 9	0,00000	0,18203	0,7688 5	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,25381	21,5320 1	0,0000 0	0,16383	0,6919 6
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,28300	29,0634 5	0,00000	0,19222	0,7485 6	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,24904	25,5758 4	0,0000 0	0,17300	0,6737 0
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,18745	29,0095 9	0,00000	0,19586	0,8593 1	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,16496	25,5284 4	0,0000 0	0,17627	0,7733 8
7,37366	0,0000 0	0,0000 0	0,24139	23,4095 5	0,00000	0,15992	1,5592 0	6,48882	0,0000 0	0,0000 0	0,21242	20,6004 0	0,0000 0	0,14393	1,4032 8
3,43300	0,0000 0	0,0000 0	0,28413	23,5632 0	0,00000	0,14127	0,4275 4	3,02104	0,0000 0	0,0000 0	0,25003	20,7356 1	0,0000 0	0,12715	0,3847 9
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,22856	10,6176 5	0,00000	0,00000	0,1870 2	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,20113	9,34353	0,0000 0	0,00000	0,1683 2
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,19802	10,3555 2	0,00000	0,09100	0,2139 5	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,17426	9,11286	0,0000 0	0,08190	0,1925 5
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,31236	17,2000 4	0,00000	0,11605	0,6883 7	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,27487	15,1360 4	0,0000 0	0,10444	0,6195 4
0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,23670	17,3875 4	0,00000	0,07557	0,6518 9	0,00000	0,0000 0	0,0000 0	0,20830	15,3010 4	0,0000 0	0,06801	0,5867 0

Apêndice B – Exemplos de cálculos.

Extração e Isolamento.

Para a determinação do rendimento após o isolamento foi necessário ter em conta a massa de pasta seca e a massa de xilana impura após liofilização. Na equação (1) encontra-se um exemplo de cálculo de rendimento para a Extração 1.

$$\eta_{\text{extração}} = \frac{m_{\text{xyl impura}}}{m_{\text{xyl na pasta antes da extração}} \times 100 = \frac{14,41}{8,5} \times 100 = 169,5 \quad (1)$$

Tendo em conta o teor de cinzas determinou-se o rendimento exato de xilanas extraídas. Na equação (2) encontra-se o exemplo de cálculo de rendimento de xilanas para a Extração 1.

$$\eta_{\text{xyl}} = \eta_{\text{extração}} \times (100 - \text{teor de cinzas}) = 169,5 \times 41 = 69,50 \quad (2)$$

Caracterização das xilanas.

Na análise por GC a determinação da quantidade de monossacarídeo numa dada amostra (% *monos.*) foi realizada de acordo com o seguinte esquema de cálculo. Deve ter-se em conta que para cada amostra foram realizadas duas injeções no GC e à respetiva réplica também. As equações 3 a 5 são exemplos de cálculo para a determinação da quantidade de xilose presente na amostra correspondente à Extração 1 numa injeção.

$$m_{\text{açucar xilose}} = \frac{A_{\text{pico xilose}} \times FR_{\text{xilose}} \times m_{PI}}{A_{\text{pico PI}}} = \frac{469103 \times 1,0215 \times 2,006 \text{ mg}}{446721} = 2,152 \text{ mg} \quad (3)$$

$$m_{PI} = V_{PI} \times C_{PI} = 0,2 \text{ mL} \times 10,03 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 2,006 \text{ mg} \quad (4)$$

$$\% \text{ xilose} = \frac{m_{\text{açucar xilose}}}{m_{\text{xyl1}}} \times 100 = \frac{2,152 \text{ mg}}{10,10 \text{ mg}} \times 100 = 21,30\% \quad (5)$$

Determinada a quantidade de monossacarídeos de todas as amostras e respetivas réplicas determinou-se a quantidade relativa de cada monossacarídeo nessa amostra. As equações 6 a 8 são exemplos de cálculo para a Extração 1.

$$m_{monossacarideos} = \sum m_{açúcar_x} = 3,0151 \text{ mg} \quad (6)$$

Onde x =ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose, manose, galactose ou glucose.

$$\% \text{ monos}_{xyl1} = \frac{m_{monossacarideos}}{m_{xyl1}} \times 100 = \frac{3,0151 \text{ mg}}{10,10 \text{ mg}} \times 100 = 29,9\% \quad (7)$$

Relativamente à xilose:

$$\% \text{ xilose} = \frac{m_{açúcar_{xilose}}}{m_{monossacarideos}} \times 100 = \frac{2,152 \text{ mg}}{3,0151 \text{ mg}} \times 100 = 71,4\% \quad (8)$$

Na caracterização por ressonância magnética nuclear por próton foi necessário realizar um tratamento estatístico dos grupos estruturais para poder determinar a abundância relativa de cada uma dessas estruturas em 100 unidades de repetição de $xylp$. As equações (9) a (10) são exemplo de cálculo da abundância relativa de unidades $xylp$.

Da Tabela 13 do Apêndice A sabe-se que o somatório das estatísticas das várias unidades estruturais é 40,66.

Para 100 unidades de repetição, o fator de correção (FC) é dado pela seguinte equação:

$$FC = \frac{N_{100}}{\sum estatística} = \frac{100}{40,66} = 2,46 \quad (9)$$

E portanto, a abundância relativa de $xylp$ é dado por:

$$\text{Abundância relativa} = FC \times estatística = 2,46 \times 37,3 = 91,8 \quad (10)$$

Modificação de xilanas.

Para determinar as quantidades necessárias de EDC e ADH assim como de amostra na Modificação A.1.1. foi necessário realizar cálculos prévios baseados no artigo de Tejano *et al.*

No artigo usaram 40 mg de celulose microcristalina (CMC) com $M_w = 220 \text{ g/mol}$ e grau de substituição 0,7. Determinou-se assim a quantidade molar de CMC (equação (11)).

$$n_{CMC} = \frac{m_{CMC}}{M_w} = \frac{40 \text{ mg}}{220 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}} = 0,2 \text{ mmol de CMC} \quad (11)$$

Tendo em conta o grau de substituição sabemos que apenas uma parte reage (equação (12)):

$$\begin{aligned} n_{CMC, reage} &= n_{CMC} \times \text{grau de substituição} = 0,2 \text{ mmol} \times 0,7 \\ &= 0,14 \text{ mmol de CMC que reage} \end{aligned} \quad (12)$$

Nas nossas reações usamos xilanas em vez de celulose, para tal foi necessário determinar a quantidade de grupos carboxílicos disponíveis para reagir. As equações (13) a (15) representam exemplos de cálculo para determinar a quantidade de grupos carboxílicos.

Tendo em conta que para a xilana correspondente à Extração 1 a $M_w = 132 \text{ g/mol}$, o teor de cinzas é de 54,4%, é usada 500 mg de amostra correspondente à Extração 1 e esta só apresenta uma abundância relativa de 8 grupos carboxílicos em cada 100 unidades:

$$m_{xyl1} = m_{amostra} \times (1 - \text{teor de cinzas}) = 500 \text{ mg} \times (1 - 0,54) = 203 \text{ mg} \quad (13)$$

$$n_{xyl1} = \frac{m_{xyl1}}{M_w} = \frac{203 \text{ mg}}{132 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}} = 1,54 \text{ mmol de xylp} \quad (14)$$

$$n_{COOH} = n_{xyl1} \times \frac{\text{abundância relativa}}{100} = 1,54 \text{ mmol} \times \frac{8}{100} = 0,1232 \text{ mmol} \quad (15)$$

No artigo eles usaram a proporção $COOH:EDH:ADH = 0,14 \text{ mmol}:1,3 \text{ mmol}:1 \text{ mmol}$. Foi decidido em conjunto com o professor Dmitry que se iriam usar as proporções $COOH:EDH:ADH = 0,1232 \text{ mmol}:0,7 \text{ mmol}:55 \text{ mmol}$.

Caracterização de xilanas modificadas.

Para a determinação da proporção de *MeGlcA:ADH* real foi necessário recorrer a uma análise estatística da ressonância magnética de próton.

Definiu-se como intervalos de integração os picos nas zonas dos 3.8 e 2.5 ppm correspondentes aos prótons H-4 e CH^a₂, respetivamente. Da integração registou-se como valores estatísticos 1 correspondente ao H-4 da unidade de *Xylp*, e 0.75 correspondente aos dois CH^a₂ da cadeia de hidrazida inserida na estrutura. Para cada unidade de *Xylp* existem 0,375 unidades de ácido, o que representa um grau de substituição muito elevado.

Para a determinação da proporção real de grupos ácidos na xilana modificada em análise teve de se ter em conta que em 100 unidades de *Xylp* existem 8 grupos carboxílicos, mas na realidade apenas 37,5 unidades de ADH é que reagiram. Assim sendo, a proporção de grupos hidrazida que reagiu na realidade foi,

$$\frac{8 \text{ unidades MeGlcA}}{37,5 \text{ unidades de ADH}} \times 100 \text{ unidades de Xylp} = 4,6 \text{ unidades de ADH.}$$